



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

DIRECCIÓN DE POSGRADOS

Especialidad en Periodoncia e Implantología Quirúrgica

Susceptibilidad Antimicrobiana del Propóleo frente a *Agregatibacter actinomycetemcomitans*: Estudio *In-Vitro*

**INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE ESPECIALISTA EN PERIODONCIA E IMPLANTOLOGÍA
QUIRÚRGICA**

AUTOR: OD. KAMILA RAFAELA CALDERÓN RUILOVA

DIRECTOR: DRA. JESSICA MARÍA SARMIENTO ORÓÑÉZ, MSC

CUENCA - ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

DIRECCIÓN DE POSGRADOS

Especialidad en Periodoncia e Implantología Quirúrgica

Susceptibilidad Antimicrobiana del Propóleo frente a *Agregatibacter actinomycetemcomitans*: Estudio *In-Vitro*

INFORME DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN PERIODONCIA E IMPLANTOLOGÍA QUIRÚRGICA

AUTOR: KAMILA RAFAELA CALDERÓN RUILOVA

DIRECTOR: DRA. JESSICA MARÍA SARMIENTO ORDÓÑEZ, MSc

CUENCA – ECUADOR

2026

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

Certificado del Asesor

Se certifica que:

El informe de investigación “**Suceptibilidad antimicrobiana del Propóleo frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: estudio *In-Vitro***”, de autoría del Sr./a “**Kamila Rafaela Calderon Ruilova**” con número de identidad **0106826225**, con nacionalidad **Ecuatoriana**, previo a la obtención del Título de Cuarto Nivel o Posgrado correspondiente a **Especialista en Periodoncia e Implantología Quirúrgica**, cumple con la caracterización y estructura (parte protocolaria y parte expositiva) y se sujeta a la normativa pertinente exigida por el Consejo de Educación Superior, CES y la Universidad Católica de Cuenca, en consecuencia se autoriza su presentación para los tramites pertinentes.

Santa Ana de los Ríos de Cuenca

Cuenca, agosto del 2026

Tutora

Dra. Jéssica María Sarmiento Ordóñez, MsC

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Kamila Rafaela Calderón Ruilova portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0106826225**.

Declaro ser el autor de la obra: “**Suceptibilidad antimicrobiana del Propóleo frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: Estudio *In-Vitro***”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, agosto del 2026

F:

Kamila Rafaela Calderón Ruilova

C.I. 0106826225

Agradecimiento

Agradezco profundamente a Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi formación profesional y darme la fortaleza necesaria para superar cada desafío.

A mi esposo y a mis padres, por acompañarme durante este proceso, por su comprensión, motivación y apoyo permanente.

Expreso también mi sincero agradecimiento a mis docentes de último año, quienes, a través de sus conocimientos, experiencia y orientación, contribuyeron significativamente a mi formación académica y me impulsaron a ser mejor cada día.

Finalmente, agradezco a todas aquellas personas que, de una u otra manera, formaron parte de este camino y contribuyeron a la culminación de esta importante etapa de mi vida.

Dedicatoria

Dedico este trabajo, en primer lugar, a Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada etapa de este camino.

A mi esposo, por su amor, paciencia y apoyo incondicional, por acompañarme en cada desafío y celebrar conmigo cada logro.

A mis padres, por ser el fundamento de quien soy, por su amor, esfuerzo y confianza constante, y por enseñarme que con perseverancia y dedicación es posible alcanzar cada meta.

Índice

Tabla de contenido

Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Antecedentes y contextualización	1
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Formulación del problema.....	4
1.4 Justificación	4
1.5 Objetivos.....	5
1.5.1 Objetivo general	5
1.5.2 Objetivos específicos	5
1.6 Hipótesis.....	5
Capítulo 2: Marco Teórico	6
2.1. Antecedentes de la investigación	6
2.2. Bases teóricas.....	8
2.2.1. Periodontitis y relevancia epidemiológica	8
2.2.2. Microbiología periodontal y biopelícula	11
2.2.3. Aggregatibacter actinomycetemcomitans	13
2.2.4. Propóleo: origen y naturaleza	15
2.2.5. Compuestos bioactivos y actividad antimicrobiana del propóleo	16
2.2.6. Propóleo frente a microorganismos periodontopatógenos	17
2.2.7. Actividad frente a Aggregatibacter actinomycetemcomitans	17
2.2.8. Clorhexidina como referente comparativo.....	18
2.3. Marco conceptual	18
2.4. Marco legal y normativo aplicable.....	20
CAPITULO III: MARCO METODOLÓGICO	20
3.1 Enfoque y tipo de investigación.....	20
3.2 Diseño de la investigación	20
3.3 Población y muestra	20
3.4 Técnicas e instrumentos.....	21
3.1.1 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo	21
3.4.2. Productos de propóleo evaluados	21
3.4.3. Ensayo de difusión en disco	21
3.4.4. Microdilución en caldo y determinación de la CMI	22
3.5 Validez y Confiabilidad	23
3.6 Procedimiento.....	23
3.7 Consideraciones éticas	24

3.8 Métodos de análisis de datos	24
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	26
4.1 Presentación de los resultados.....	26
4.1.1 Susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión en disco	26
4.1.2 Determinación de la mínima concentración inhibitoria mediante microdilución en caldo	29
4.2 Discusión	32
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PROPUESTA	38
5.1 Conclusiones	38
5.2 Recomendaciones.....	43

Resumen

Problema: La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial asociada a una microbiota subgingival disbiótica, en la que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* constituye un periodontopatógeno de interés por sus mecanismos de colonización, persistencia y virulencia.

La búsqueda de sustancias con potencial antimicrobiano frente a este microorganismo ha generado interés en productos naturales como el propóleo. **Objetivo:** Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de propóleos comerciales frente a *A.*

actinomycetemcomitans. **Metodología:** Se realizó un estudio experimental *in vitro* en el que se evaluaron 21 propóleos comerciales mediante difusión en disco por triplicado, utilizando clorhexidina al 0,12 % como control positivo y alcohol como control negativo. Los resultados fueron analizados mediante estadística descriptiva y análisis de varianza de una vía.

Posteriormente, dos de los propóleos con mayor actividad fueron seleccionados aleatoriamente para su evaluación mediante microdilución seriada. **Principales resultados:** Los propóleos comerciales presentaron una actividad antimicrobiana variable, identificándose productos con mayor capacidad inhibitoria y otros sin inhibición adicional detectable. La microdilución evidenció un comportamiento compatible con inhibición del crecimiento bacteriano dentro del intervalo evaluado. **Conclusión:** Determinados propóleos comerciales presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *A. actinomycetemcomitans*; sin embargo, esta actividad difiere entre productos, por lo que no debe generalizarse a todos los propóleos comerciales y requiere mayor caracterización y estandarización.

Palabras clave: propóleo, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, periodontitis, actividad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria.

Abstract

Problem: Periodontitis is a multifactorial inflammatory disease associated with a dysbiotic subgingival microbiota, in which *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is regarded as a periodontopathogen of particular relevance owing to its mechanisms of colonization, persistence, and virulence. The search for substances with antimicrobial potential against this microorganism has prompted growing interest in natural products such as propolis. **Objective:** To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of commercial propolis products against *A.*

actinomycetemcomitans. **Methodology:** An experimental *in vitro* study was conducted in which 21 commercial propolis products were evaluated in triplicate using the disk diffusion method, with 0.12% chlorhexidine and alcohol serving as positive and negative controls, respectively.

Data were analyzed using descriptive statistics and one-way analysis of variance. Subsequently, two of the propolis products exhibiting the greatest inhibitory activity were randomly selected for serial broth microdilution testing. **Main results:** The commercial propolis products exhibited variable antimicrobial activity, with some products demonstrating greater inhibitory capacity, whereas others showed no additional detectable inhibition. Microdilution testing revealed a pattern consistent with bacterial growth inhibition within the experimental range

evaluated. **Conclusion:** Certain commercial propolis products exhibit *in vitro* antimicrobial activity against *A. actinomycetemcomitans*; however, this activity varies among products and should therefore not be generalized to all commercially available propolis formulations. Further chemical characterization, standardization, and microbiological evaluation are warranted.

Keywords: propolis, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, periodontitis, antimicrobial activity, minimum inhibitory concentration.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Antecedentes y contextualización

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica de los tejidos de soporte del diente, cuya etiología está estrechamente relacionada con el biofilm microbiano. Las formas severas de enfermedad periodontal afectan a más de mil millones de personas en el mundo, lo que representa una importante carga para la salud pública (World Health Organization, 2025). En Ecuador, estudios locales también han evidenciado una elevada frecuencia de alteraciones periodontales. Por ejemplo, un estudio realizado en escolares de 12 años de Chiquintad, Cuenca, reportó signos clínicos de enfermedad periodontal en el 71 % de los participantes (Naranjo, 2019).

Entre los microorganismos de relevancia periodontal se encuentra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bacteria gramnegativa asociada con cuadros periodontales de rápida progresión y con capacidad para colonizar el ambiente subgingival. Este microorganismo posee diversos factores de virulencia, entre ellos la leucotoxina A y la toxina distensora citoletal, y puede interactuar con tejidos y células del hospedero, favoreciendo los procesos de destrucción periodontal (Hbibí et al., 2022).

El tratamiento periodontal se fundamenta principalmente en el control mecánico del biofilm; en determinadas situaciones clínicas pueden emplearse agentes antimicrobianos como coadyuvantes. Sin embargo, la aparición de resistencia bacteriana y los efectos adversos asociados al uso de determinados antimicrobianos han favorecido la investigación de sustancias complementarias de origen natural. En este contexto, los productos apícolas, particularmente el

propóleo, han recibido atención por sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes(Figueiredo et al., 2022a; Nader, Mackieh, Wehbe, Obeid, et al., 2021).

El propóleo es una mezcla resinosa recolectada y procesada por abejas, principalmente *Apis mellifera*, a partir de brotes, exudados y otras fuentes vegetales. Su composición química depende de la procedencia geográfica y de la flora disponible; entre sus componentes destacan compuestos fenólicos y flavonoides relacionados con diferentes actividades biológicas(Figueiredo et al., 2022a; Gebara, Luiz, et al., 2002; Nader, Mackieh, Wehbe, Obeid, et al., 2021). Su actividad antibacteriana puede involucrar alteraciones de la integridad de estructuras bacterianas, interferencia con procesos metabólicos y modulación de la formación de biopelículas.

Diversos estudios han evaluado *in vitro* el efecto del propóleo sobre microorganismos orales y periodontopatógenos. Investigaciones con propóleos brasileños han mostrado inhibición de *A. actinomycetemcomitans* a bajas concentraciones(Santos et al., 2003). Asimismo, un estudio realizado con propóleo de Hubballi, India, reportó actividad antibacteriana frente a *A. actinomycetemcomitans* y una concentración mínima inhibitoria entre 0,1 y 0,25 mg/mL (Srinivas et al., 2022). También se ha descrito actividad inhibitoria de extractos de propóleo frente a *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (Agarwal et al., 2012).

La actividad del propóleo también ha sido estudiada en modelos de biopelículas subgingivales complejas. Miranda et al. observaron que el propóleo rojo brasileño, a una concentración de 1.600 µg/mL, redujo en aproximadamente 45 % la actividad metabólica de una biopelícula multiespecie, sin diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo tratado con clorhexidina (Miranda et al., 2019). En estudios comparativos, el propóleo ha mostrado actividad antimicrobiana frente a patógenos orales, aunque su comportamiento puede diferir del

de la clorhexidina según el microorganismo y la organización del biofilm (Akca et al., 2016). De forma complementaria, una revisión sistemática con metaanálisis reportó beneficios del propóleo como coadyuvante en el tratamiento periodontal, particularmente en parámetros clínicos como la profundidad de sondaje (López-Valverde et al., 2021).

1.2 Planteamiento del problema

La elevada carga de la enfermedad periodontal y la participación de microorganismos con mecanismos de virulencia complejos, como *A. actinomycetemcomitans*, justifican la búsqueda de estrategias antimicrobianas complementarias (Hbib et al., 2022; World Health Organization, 2025). Aunque el propóleo ha demostrado actividad antimicrobiana en diferentes estudios, su composición y su eficacia pueden variar en función de su origen botánico y geográfico, del método de extracción, del solvente empleado y de la concentración utilizada (Figueiredo et al., 2022b; Gebara, Lima, et al., 2002; Nader, Mackieh, Wehbe, El Obeid, et al., 2021). Por esta razón, los resultados obtenidos con propóleos procedentes de otros países no pueden extrapolarse de manera directa a todos los extractos disponibles localmente.

En la evidencia revisada para este estudio existe información sobre la actividad del propóleo frente a microorganismos periodontales (Agarwal et al., 2012; Akca et al., 2016; Figueiredo et al., 2022b; López-Valverde et al., 2021; Miranda et al., 2019; Santos et al., 2003; Srinivas et al., 2022); sin embargo, continúa siendo limitada la información específica sobre la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* frente a propóleos comerciales disponibles en Ecuador y evaluados bajo condiciones experimentales comparables. Este vacío de conocimiento dificulta establecer si estos extractos presentan un efecto inhibitorio reproducible y cuál es su comportamiento frente a un antiséptico de referencia como la clorhexidina. En consecuencia, resulta necesario evaluar experimentalmente su actividad mediante métodos microbiológicos que

permitan cuantificar la inhibición bacteriana y determinar concentraciones inhibitorias y bactericidas.

1.3 Formulación del problema

¿Cuál es la actividad antimicrobiana *in vitro* de los propóleos comerciales disponibles comercialmente en Ecuador frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), determinada mediante difusión en disco y microdilución en caldo?

1.4 Justificación

Desde el punto de vista teórico, esta investigación aporta evidencia experimental sobre la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* frente propóleo comercial y contribuye a ampliar el conocimiento acerca de un producto natural cuya actividad antimicrobiana puede variar de acuerdo con sus características químicas y su procedencia (Figueiredo et al., 2022b; Nader, Mackieh, Wehbe, El Obeid, et al., 2021; Srinivas et al., 2022). La determinación de parámetros microbiológicos permite generar información comparable con estudios previos y establecer una base para investigaciones posteriores.

En el ámbito práctico, la evaluación mediante difusión en disco y microdilución permite valorar objetivamente el efecto inhibitorio de los propóleos y contrastarlo con un control antimicrobiano de referencia. Esta información puede orientar futuras investigaciones destinadas al desarrollo de formulaciones coadyuvantes para el control de microorganismos periodontopatógenos, sin asumir todavía eficacia clínica. En el ámbito social y sanitario, el estudio es pertinente debido a la elevada carga mundial de las enfermedades periodontales (World Health Organization, 2025) y al interés por identificar alternativas complementarias que, después de demostrar seguridad y eficacia en estudios preclínicos y clínicos, puedan contribuir al manejo periodontal (Figueiredo et al., 2022b; López-Valverde et al., 2021).

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los propóleos comerciales frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), mediante difusión en disco y microdilución en caldo, utilizando clorhexidina al 0,12 % como control positivo.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto inhibitorio de los propóleos comerciales frente a *A. actinomycetemcomitans* mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición obtenidos por difusión en disco.
2. Evaluar de manera comparativa los diámetros de los halos de inhibición producidos por los idferentes propóelos comerciales analizados.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los propóleos comerciales frente a *A. actinomycetemcomitans* mediante microdilución en caldo.

1.6 Hipótesis

Hipótesis de investigación (H1): Los propóleos comerciales presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523), evidenciada por la formación de halos de inhibición y por la determinación de concentraciones inhibitorias superiores al efecto atribuible al vehículo etanólico.

Hipótesis nula (H0): Los propóleos comerciales no presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 29523) superior al efecto atribuible al vehículo etanólico.

Capítulo 2: Marco Teórico

2.1. Antecedentes de la investigación

La investigación sobre el propóleo como agente antimicrobiano en el ámbito periodontal se ha desarrollado desde estudios *in vitro* con microorganismos aislados hasta modelos de biopelículas multiespecie y evaluaciones clínicas. En conjunto, esta trayectoria científica ha permitido establecer que el propóleo posee actividad biológica frente a diversos microorganismos orales, aunque la magnitud del efecto depende de su composición, procedencia geográfica, método de extracción, concentración y microorganismo evaluado (Alvear et al., 2021; Figueiredo et al., 2022b; Nader, Mackieh, Wehbe, El Obeid, et al., 2021).

Entre los antecedentes experimentales directamente relacionados con el objeto de estudio, Gebara et al. (2002) evaluaron *in vitro* la actividad antimicrobiana de un extracto de propóleo frente a bacterias periodontopatógenas, entre ellas *A. actinomycescomitans*. Los autores determinaron concentraciones mínimas inhibitorias para las cepas estudiadas y documentaron susceptibilidad de *A. actinomycescomitans* al extracto. Este trabajo constituye un antecedente relevante porque demuestra, mediante una metodología de susceptibilidad antimicrobiana, que el propóleo puede ejercer un efecto inhibitorio sobre un microorganismo estrechamente relacionado con la enfermedad periodontal.

Posteriormente, Santos et al. (2003) estudiaron propóleos brasileños y relacionaron sus propiedades fisicoquímicas, origen vegetal y actividad antibacteriana frente a periodontopatógenos. Sus resultados mostraron actividad del extracto etanólico de propóleo frente a las bacterias evaluadas y reforzaron la importancia de considerar las características químicas y el origen de las muestras. Esta observación es particularmente pertinente para investigaciones que utilizan propóleos de procedencias diferentes, porque la denominación

“propóleo” no implica una composición química uniforme ya que existe varianza en la composición de un propóleo que se rige por diferentes factores como ubicación demográfica, altura, clima entre otros.

Agarwal et al. (2012) analizaron la composición química del propóleo chino y su eficacia frente a *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*. Mediante ensayos *in vitro*, evaluaron el potencial antimicrobiano y la concentración mínima inhibitoria, relacionando la actividad observada con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. El estudio aportó evidencia específica de susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* y mostró la utilidad de combinar la caracterización del producto natural con pruebas microbiológicas.

En un estudio que compara el propóleo con la clorhexidina, Akca et al. (2016) evaluaron microorganismos orales en estado planctónico y en biopelículas de una sola especie. Ambos agentes inhibieron el crecimiento de las especies planctónicas analizadas; sin embargo, la clorhexidina presentó concentraciones bactericidas menores frente a determinadas biopelículas. Este antecedente permite situar al propóleo como un agente de interés experimental sin asumir equivalencia universal con la clorhexidina.

La evidencia más reciente ha ampliado el análisis hacia comunidades microbianas complejas. Miranda et al. (2019) investigaron el extracto etanólico de propóleo rojo brasileño en un modelo de biopelícula subgingival multiespecie y observaron modificaciones en la actividad metabólica y en la composición microbiana del biofilm. Este tipo de modelo resulta relevante porque aproxima el estudio experimental a la organización característica de la microbiota periodontal, aunque no sustituye la evaluación específica de una cepa aislada cuando el objetivo es determinar su susceptibilidad directa.

En el ámbito clínico, Nakao et al. (2020) evaluaron la administración tópica de propóleo en pacientes con periodontitis crónica. El grupo tratado con propóleo mostró mejoras en parámetros periodontales y una tendencia a la reducción de *P. gingivalis*. Por su parte, López-Valverde et al. (2021), mediante una revisión sistemática con metaanálisis, reunieron evidencia sobre el empleo del propóleo en enfermedad periodontal. Estos trabajos apoyan el interés odontológico por lo que los ensayos clínicos son de principal interés para reproducir los procesos y los métodos, y poderlos aplicar de manera clínica a estudios con propóleos Ecuatorianos.

Srinivas et al. (2022) evaluaron *in vitro* un propóleo procedente de Hubballi (India) frente a *A. actinomycetemcomitans* y documentaron actividad antibacteriana. Al mismo tiempo, la variabilidad química descrita para propóleos de distintas regiones impide asumir que los resultados obtenidos con una muestra geográfica determinada sean directamente reproducibles con propóleo Ecuatoriano (Alvear et al., 2021; Kurek-Górecka et al., 2022).

Dado que, entre tantos estudios realizados en diferentes regiones del mundo, no se menciona un estudio experimental en población Ecuatoriana o con propóleos provenientes de Ecuador que determine específicamente la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* frente a extractos etanólicos de propóleo ecuatoriano ni su utilización en ensayos clínicos con pacientes directamente. Esta ausencia sustenta la pertinencia de generar evidencia local sin afirmar que exista una ausencia absoluta de estudios fuera de las fuentes revisadas.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Periodontitis y relevancia epidemiológica

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria multifactorial que compromete los tejidos de soporte dentario y cuya etiopatogenia está estrechamente relacionada con la interacción entre una biopelícula microbiana disbiótica y la respuesta del huésped. El proceso patológico no depende de la presencia aislada de una especie bacteriana, sino de alteraciones en

el equilibrio de la microbiota subgingival que favorecen el establecimiento y persistencia de comunidades microbianas asociadas con inflamación y destrucción periodontal. Figueiredo et al. (2022) describen a la periodontitis como una enfermedad compleja y multifactorial en cuya etiología el componente microbiano desempeña un papel esencial.

La acumulación y maduración del biofilm dental favorecen cambios en la composición de la microbiota y el desarrollo de un ambiente subgingival capaz de mantener una respuesta inflamatoria persistente. Los microorganismos presentes en estas comunidades se organizan en biopelículas, estructuras adheridas a las superficies y protegidas por una matriz extracelular que modifica su comportamiento biológico. Esta organización puede aumentar su capacidad de persistencia y producir una respuesta diferente frente a los agentes antimicrobianos en comparación con las bacterias en estado planctónico, aspecto demostrado en estudios experimentales con microorganismos periodontales (Akca et al., 2016; Miranda et al., 2019).

La progresión de la enfermedad resulta de la interacción continua entre el desafío microbiano y la respuesta del hospedero. Cuando este equilibrio se altera, la inflamación deja de constituir únicamente un mecanismo protector y puede contribuir progresivamente al daño de los tejidos periodontales. Por ello, la periodontitis no debe interpretarse como una infección producida exclusivamente por un microorganismo específico, sino como el resultado de una comunidad microbiana alterada que actúa dentro de un huésped susceptible. Esta característica explica, en parte, la variabilidad en la presentación y progresión de la enfermedad y sustenta su consideración como un proceso de etiología multifactorial.

Dentro de la microbiota asociada a la periodontitis se encuentran microorganismos capaces de expresar factores de virulencia que favorecen la colonización, persistencia y daño tisular. Entre ellos destaca *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bacteria gramnegativa

asociada especialmente con formas periodontales de mayor severidad y progresión. Hbibi et al. (2022) señalan que este microorganismo presenta diferentes mecanismos de patogenicidad, entre los que se encuentran la leucotoxina A, la toxina distensora citoletal, mecanismos de adhesión e invasión y capacidad para interactuar con las células del hospedero. Estas características favorecen su permanencia en el entorno periodontal y explican su importancia como microorganismo de interés en investigaciones dirigidas al control antimicrobiano.

No obstante, la presencia de *A. actinomycetemcomitans* por sí sola no explica el desarrollo de la periodontitis. Su participación ocurre dentro de un ecosistema microbiano complejo en el que diversas especies establecen interacciones y contribuyen al mantenimiento de la disbiosis. Esta característica resulta especialmente importante desde el punto de vista terapéutico, debido a que el control periodontal requiere reducir y modificar la biopelícula en su conjunto y no únicamente eliminar una especie bacteriana determinada.

Desde el punto de vista epidemiológico, la importancia de la periodontitis se relaciona tanto con la pérdida progresiva del soporte dentario como con su elevada frecuencia en la población. La Organización Mundial de la Salud (2025) reconoce a las enfermedades periodontales graves entre las principales condiciones de salud bucodental a escala mundial. De forma complementaria, Trindade et al. (2023), mediante una revisión sistemática y metaanálisis de estudios epidemiológicos realizados entre 2011 y 2020, determinaron una elevada prevalencia de periodontitis en adultos dentados y evidenciaron que las estimaciones pueden variar según la edad de las poblaciones estudiadas y los criterios diagnósticos empleados.

Desde la perspectiva de esta investigación, la relevancia de la periodontitis no radica únicamente en su frecuencia, sino también en la complejidad microbiológica de su etiopatogenia. La organización de los microorganismos periodontopatógenos en biopelículas y su permanencia

en nichos subgingivales dificultan su control y justifican la búsqueda de estrategias complementarias capaces de ejercer actividad antimicrobiana. En este contexto, los productos naturales han adquirido interés dentro de la investigación periodontal, entre ellos el propóleo, debido a las propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes descritas en la literatura (Figueiredo et al., 2022; Nader, Mackieh, Wehbe, El Obeid, et al., 2021).

2.2.2. Microbiología periodontal y biopelícula

La microbiota periodontal constituye una comunidad microbiana compleja que se organiza principalmente en biopelículas adheridas a las superficies dentarias y al ambiente subgingival. Estas estructuras están constituidas por microorganismos inmersos en una matriz extracelular que favorece su adhesión, interacción y persistencia en el nicho periodontal. La organización en biopelícula modifica el comportamiento de las bacterias y su respuesta frente a las condiciones ambientales y a los agentes antimicrobianos, por lo que una bacteria en estado planctónico puede presentar una susceptibilidad diferente cuando se encuentra integrada en una comunidad microbiana estructurada. Akca et al. (2016) evidenciaron diferencias en la actividad antimicrobiana frente a microorganismos orales en estado planctónico y organizados en biopelículas, mientras que Miranda et al. (2019) demostró que el propóleo puede modificar parámetros microbiológicos y metabólicos en un modelo de biofilm subgingival multiespecie.

La transición desde una microbiota compatible con salud periodontal hacia una comunidad asociada con enfermedad implica modificaciones en la abundancia relativa y en las interacciones entre diferentes especies bacterianas. Históricamente, estas asociaciones fueron descritas mediante complejos microbianos, agrupando especies según su frecuencia de coexistencia y su relación con las condiciones clínicas periodontales. Dentro de esta organización, el complejo naranja incluye especies como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* y *Campylobacter rectus*, entre otras, y se ha relacionado con la transición hacia

comunidades microbianas asociadas con enfermedad. Por su parte, el complejo rojo, integrado clásicamente por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, ha mostrado una estrecha asociación con parámetros clínicos de destrucción periodontal.

Estas asociaciones permiten comprender que la patogenicidad periodontal no depende exclusivamente de la presencia de una especie aislada, sino de las interacciones establecidas dentro de la comunidad microbiana. Algunas bacterias pueden facilitar la adhesión o incorporación de otras especies, modificar las condiciones del microambiente y contribuir a la maduración de la biopelícula subgingival. De esta manera, la cooperación y coexistencia entre microorganismos favorecen la formación de comunidades más complejas y persistentes, capaces de mantener una interacción continua con los tejidos periodontales.

La relación entre la biopelícula y el huésped constituye otro componente fundamental de este proceso. Los microorganismos y sus productos interactúan con las células del epitelio y del sistema inmunitario, generando respuestas destinadas inicialmente a contener el desafío microbiano. Sin embargo, cuando la disbiosis persiste, la respuesta inflamatoria mantenida puede contribuir al daño de los tejidos de soporte periodontal. En consecuencia, la destrucción periodontal no debe interpretarse únicamente como el resultado de una agresión bacteriana directa, sino como el producto de una interacción dinámica entre una comunidad microbiana disbiótica y la respuesta del hospedero.

Dentro de esta comunidad existen microorganismos con características particulares de virulencia que pueden contribuir de manera importante a la alteración del equilibrio periodontal. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merece especial atención debido a su asociación con formas de periodontitis de rápida progresión y a su capacidad para colonizar el ambiente subgingival. A diferencia de las especies que conforman clásicamente los complejos rojo y

naranja, *A. actinomycetemcomitans* ha sido reconocido como un periodontopatógeno con características microbiológicas y mecanismos de virulencia propios. Hbibi et al. (2022) destacan su capacidad de adhesión y colonización, formación de biopelícula, interacción con células del hospedero y producción de factores de virulencia que pueden favorecer su persistencia y patogenicidad.

2.2.3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria gramnegativa, facultativamente anaerobia y capnófila, reconocida como un periodontopatógeno de importancia debido a su asociación con formas de periodontitis de rápida progresión y a la diversidad de mecanismos que favorecen su colonización, persistencia y capacidad de alterar los tejidos periodontales. Su relevancia patogénica no depende únicamente de su presencia en el ambiente subgingival, sino de la expresión de diferentes factores de virulencia que le permiten interactuar con otros microorganismos y con las células del huésped (Hbibi et al., 2022).

La capacidad de adhesión y formación de biopelícula constituye uno de los primeros elementos necesarios para su establecimiento en el nicho periodontal. *A. actinomycetemcomitans* posee estructuras y proteínas de superficie que favorecen su adhesión a superficies y células del hospedero, permitiéndole colonizar y persistir en el ambiente subgingival. La formación de comunidades bacterianas adheridas contribuye, además, a generar condiciones que dificultan su eliminación y modifican su susceptibilidad frente a los agentes antimicrobianos. Esta capacidad de persistencia resulta particularmente relevante en la enfermedad periodontal, donde el control de los microorganismos organizados en biopelículas representa un desafío mayor que el control de células bacterianas en estado planctónico (Hbibi et al., 2022; Akca et al., 2016).

Entre sus factores de virulencia destaca particularmente la leucotoxina A (LtxA), considerada uno de los principales determinantes de patogenicidad de *A.*

actinomycetemcomitans. Esta toxina puede afectar células del sistema inmunitario del huésped, principalmente leucocitos, interfiriendo con mecanismos encargados de controlar la infección bacteriana. El daño o alteración funcional de estas células favorece la supervivencia del microorganismo en el entorno periodontal y contribuye al mantenimiento de una respuesta inflamatoria local. La producción de leucotoxina no es necesariamente equivalente entre todas las cepas, por lo que aquellas con mayor expresión de este factor pueden presentar un potencial patogénico diferente (Hbibí et al., 2022).

Otro factor relevante es la toxina distensora citoletal (CDT), capaz de interferir con el ciclo celular de las células del hospedero. Su acción puede provocar alteraciones celulares que incluyen detención de la proliferación y cambios que comprometen la viabilidad y función de las células afectadas. En el contexto periodontal, esta capacidad contribuye a alterar la homeostasis de los tejidos y puede favorecer un ambiente compatible con persistencia bacteriana e inflamación. De esta manera, la acción patogénica de *A. actinomycetemcomitans* no se limita a la colonización de la bolsa periodontal, sino que incluye mecanismos capaces de modificar directamente la respuesta y función de las células del huésped (Hbibí et al., 2022).

La bacteria posee además componentes propios de su estructura gramnegativa, entre ellos el lipopolisacárido (LPS), capaces de interactuar con mecanismos de reconocimiento inmunitario del hospedero y promover la producción de mediadores inflamatorios. Cuando este estímulo se mantiene dentro del ambiente periodontal, la respuesta inflamatoria puede contribuir indirectamente a los procesos responsables de la destrucción del tejido conectivo y del soporte óseo. Por tanto, parte del daño periodontal asociado a la infección no deriva exclusivamente de la acción directa de los productos bacterianos, sino también de la respuesta inflamatoria del propio huésped frente al desafío microbiano.

La capacidad de *A. actinomycetemcomitans* para adherirse, formar biopelículas, interactuar con células del huésped, evadir mecanismos de defensa y producir toxinas explica su relevancia dentro de la etiopatogenia periodontal. Estos mecanismos pueden actuar de manera conjunta, favoreciendo la persistencia del microorganismo en el nicho subgingival y manteniendo condiciones que contribuyen a la inflamación y destrucción de los tejidos de soporte. En consecuencia, su patogenicidad debe comprenderse como el resultado de la interacción de múltiples factores de virulencia y no como el efecto aislado de una única toxina (Hbib et al., 2022).

Desde el punto de vista microbiológico, estas características también explican el interés por estudiar la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* frente a diferentes sustancias antimicrobianas. La capacidad de persistir en el ambiente periodontal y de expresar factores que interfieren con la respuesta del huésped convierte su control en un aspecto relevante dentro de la investigación periodontal. Estudios *in vitro* incluidos en los antecedentes de esta investigación han demostrado que su crecimiento puede ser inhibido por propóleo bajo diferentes condiciones experimentales, aunque la magnitud de la actividad depende de la preparación y concentración evaluadas (Khodijah et al., 2017; Srinivas et al., 2022).

En este contexto, es fundamental la necesidad de explorar sustancias con potencial actividad antimicrobiana frente a un microorganismo que posee mecanismos especializados de colonización, persistencia y virulencia.

2.2.4. Propóleo: origen y naturaleza

El propóleo es un material resinoso elaborado por las abejas a partir de sustancias de origen vegetal que son recolectadas y transformadas para su utilización en la colmena. Los productos de la colmena contienen numerosos compuestos bioactivos y han sido estudiados por

sus propiedades antibacterianas (Nader et al., 2021). En el caso del propóleo, su interés científico se relaciona especialmente con la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, aunque la proporción y naturaleza de estos componentes no es constante.

La composición del propóleo depende de factores geográficos y botánicos. Alvear et al. (2021) mostraron que el área de recolección determina diferencias en la composición química y el potencial antimicrobiano de propóleos chilenos. Kurek-Górecka et al. (2022) también documentaron diferencias en el perfil fenólico de muestras procedentes de distintas regiones geográficas. Estos hallazgos sustentan una consideración esencial para el presente estudio: los resultados obtenidos con propóleos de otros países constituyen antecedentes, pero no sustituyen la caracterización experimental de muestras Ecuatorianas.

2.2.5. Compuestos bioactivos y actividad antimicrobiana del propóleo

Los compuestos fenólicos y flavonoides son componentes recurrentemente asociados con las propiedades biológicas del propóleo. Nader et al. (2021) sintetizan evidencia sobre la actividad antibacteriana de productos de la colmena y señalan que la riqueza en compuestos bioactivos contribuye a su acción frente a diferentes bacterias. Agarwal et al. (2012) evaluaron específicamente fenoles y flavonoides en propóleo chino junto con su actividad frente a periodontopatógenos, lo que vincula la composición química con la respuesta microbiológica.

La actividad antimicrobiana del propóleo no debe interpretarse como una propiedad uniforme de todas las muestras. De Souza Silva et al. (2021) encontraron diferencias entre extractos de propóleo verde y rojo brasileño y describieron actividad antimicrobiana y antivirulencia frente a bacterias, mientras que Alvear et al. (2021) demostraron variación del potencial antimicrobiano asociada al área de recolección. Por tanto, la concentración del extracto, el solvente, el origen geográfico y el perfil químico son variables que deben considerarse al comparar resultados entre investigaciones.

2.2.6. Propóleo frente a microorganismos periodontopatógenos

La actividad del propóleo frente a microorganismos periodontopatógenos ha sido observada en diferentes diseños experimentales. Gebara et al. (2002) evaluaron varias bacterias relacionadas con enfermedad periodontal; Santos et al. (2003) estudiaron periodontopatógenos y características fisicoquímicas del propóleo; Agarwal et al. (2012) se concentraron en *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*; y Figueiredo et al. (2022) revisaron propiedades de diversos productos naturales, incluido el propóleo, frente a microorganismos periodontales. La convergencia de estos trabajos sustenta el interés del propóleo en investigación periodontal.

Sin embargo, la evidencia disponible también muestra que el efecto depende del modelo experimental. Akca et al. (2016) observaron actividad tanto del propóleo como de la clorhexidina frente a microorganismos planctónicos, con diferencias en biofilm. Miranda et al. (2019) utilizó una biopelícula multiespecie y evidenció un efecto del propóleo rojo brasileño sobre periodontopatógenos del complejo naranja. En consecuencia, la interpretación debe mantenerse vinculada al tipo de ensayo realizado y no extrapolarse automáticamente a eficacia clínica.

2.2.7. Actividad frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

La susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* frente al propóleo constituye el núcleo teórico más directamente relacionado con esta investigación. Gebara et al. (2002) reportaron inhibición de la bacteria mediante extracto de propóleo; Santos et al. (2003) documentaron actividad de propóleo brasileño frente a periodontopatógenos; Agarwal et al. (2012) evaluaron propóleo chino y determinaron su actividad y concentración mínima inhibitoria frente a *A. actinomycetemcomitans*; y Akca et al. (2016) incluyeron esta especie en una comparación entre propóleo y clorhexidina.

Más recientemente, Srinivas et al. (2022) demostraron actividad antibacteriana de propóleo de Hubballi frente a *A. actinomycetemcomitans*. La relevancia de este estudio radica en

confirmar que la línea de investigación continúa vigente y en destacar nuevamente que las propiedades del propóleo cambian según su procedencia. En consecuencia, evaluar extractos de propóleo disponibles en Ecuador permite producir información experimental contextualizada y comparar su comportamiento con antecedentes internacionales sin presuponer equivalencia química o microbiológica.

2.2.8. Clorhexidina como referente comparativo

La clorhexidina es utilizada con frecuencia como agente antimicrobiano de referencia en investigaciones odontológicas. Akca et al. (2016) compararon directamente la actividad del extracto etanólico de propóleo con clorhexidina frente a diversos patógenos orales y sus biopelículas. Miranda et al. (2019) también empleó clorhexidina al 0,12 % como control positivo en un modelo multiespecie. Estos antecedentes respaldan su utilidad como control comparativo en estudios *in vitro* de sustancias con potencial antimicrobiano.

El empleo de un control positivo permite interpretar si el sistema experimental es capaz de detectar inhibición y proporciona un referente para contextualizar la magnitud del efecto observado. No obstante, demostrar actividad *in vitro* del propóleo frente a un control antimicrobiano no equivale a demostrar eficacia clínica ni autoriza a sustituir tratamientos periodontales establecidos; esa transición requiere evidencia adicional de seguridad, estandarización y eficacia clínica.

2.3. Marco conceptual

Para efectos del presente estudio, los principales conceptos se delimitan de la siguiente manera:

Susceptibilidad antimicrobiana. Respuesta de un microorganismo frente a la exposición a un agente con capacidad de inhibir su crecimiento o producir muerte bacteriana, determinada mediante condiciones experimentales definidas.

Propóleo. Material resinoso elaborado por las abejas a partir de sustancias vegetales y caracterizado por una composición química variable, con presencia frecuente de compuestos fenólicos y flavonoides asociados con diversas actividades biológicas (Alvear et al., 2021; Nader, Mackieh, Wehbe, El Obeid, et al., 2021).

Extracto etanólico de propóleo (EEP). Preparación obtenida mediante extracción del propóleo utilizando etanol como solvente, empleada en numerosos ensayos de actividad antimicrobiana (Akca et al., 2016; Gebara, Lima, et al., 2002).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Bacteria gramnegativa asociada con enfermedad periodontal con importantes factores de virulencia como la leucotoxina, que ataca a los leucocitos y macrófagos y debilita la respuesta inmune del huésped. (Hbib et al., 2022).

Halo de inhibición. Zona visible sin crecimiento bacteriano alrededor de una fuente de agente antimicrobiano en un medio sólido; su diámetro constituye una medida experimental de inhibición bajo las condiciones del ensayo. (Hudzicki Jan, 2009)

Concentración mínima inhibitoria (CMI/MIC). Menor concentración de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento detectable del microorganismo en las condiciones establecidas del ensayo.

Biopelícula o biofilm. Comunidad microbiana organizada y adherida a una superficie, inmersa en una matriz, cuya respuesta a los antimicrobianos puede diferir de la observada en células planctónicas (Akca et al., 2016; Miranda et al., 2019).

Clorhexidina. Antiséptico utilizado como referente antimicrobiano en estudios odontológicos y como control positivo en investigaciones comparativas con propóleo (Akca et al., 2016; Miranda et al., 2019).

2.4. Marco legal y normativo aplicable

La presente investigación corresponde a un estudio experimental *in vitro* dirigido a evaluar la susceptibilidad antimicrobiana de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* frente a extractos etanólicos de propóleo. Debido a su naturaleza experimental, el estudio no contempla la participación de seres humanos, la utilización de información clínica o datos personales, ni el empleo de muestras biológicas de origen humano.

En consecuencia, por las características específicas del presente estudio, se requiere consentimiento informado o las consideraciones éticas propias de una investigación clínica. No obstante, la ejecución experimental debe mantener el cumplimiento de las normas institucionales de bioseguridad, buenas prácticas de laboratorio y manejo seguro de microorganismos aplicables al laboratorio en el que se desarrolla la investigación.

CAPITULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1 Enfoque y tipo de investigación

Estudio experimental *in vitro*, descriptivo-comparativo, orientado a determinar la eficacia antimicrobiana del propóleo comercial frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, bacteria periodontopatógena mediante difusión en disco, microdilución en caldo.

3.2 Diseño de la investigación

La investigación se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo-cualitativo, debido a que la actividad antimicrobiana de los productos evaluados se determinó mediante mediciones objetivas.

3.3 Población y muestra

Debido a la naturaleza *in vitro* del estudio, no existió una población de participantes humanos. La muestra experimental estuvo constituida por 21 propóleos comerciales. La cepa

microbiológica de ensayo correspondió a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, cepa de referencia ATCC 29523.

3.4 Técnicas e instrumentos

3.1.1 Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

Se utilizó *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29523. Para su cultivo se empleó en Agar Sangre preparados en cajas petri. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 48 horas en jarra de anaerobiosis.

3.4.2. Productos de propóleo evaluados

Se analizaron 21 propóleos comerciales. Las concentraciones declaradas por los fabricantes variaban entre los productos, aproximadamente entre 15 % y 50 %. Los extractos se evaluaron a partir de sus presentaciones comerciales y después de haber pasado por una doble filtración con filtros de jeringa de 0,45 y 0,2um.

3.4.3. Ensayo de difusión en disco

Para el ensayo de difusión de disco se empleó el método de Kirbi-Bauer estandarizado (Hudzicki Jan, 2009).

El inóculo bacteriano se preparó a partir de una suspensión de *A. actinomycetemcomitans* ajustada al estándar 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Con la inoculación de *A.a* se realizó la siembra del microorganismo sobre agar Mueller-Hinton a manera estriada. Luego se utilizaron discos en blanco estériles (Oxoid®) de 6 mm, sobre los cuales se aplicó 20ul de las muestras de propóleo comercial. Como control positivo se empleó clorhexidina al 0,12 % y como control negativo se utilizó alcohol al 70%.

Las cajas se incubaron durante 48 horas a 37 °C en jarras de anaerobiosis. Finalizado el periodo de incubación, se evaluó la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos y se

registraron sus diámetros en milímetros por medio de un calibrador digital de Vernier. El procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los 21 productos comerciales.

3.4.4. Microdilución en caldo y determinación de la CMI

Inicialmente para la microdilución en caldo, se consideraron solamente de las 21 muestras, los resultados positivos y con halos considerables de la difusión de disco, es decir, los que hayan mostrado eficacia y susceptibilidad ante el propóleo.

Una vez seleccionados los propóleos con resultados positivos de la difusión de discos, se prepararon inoculos de bacteria con cepa *A.a* en caldo BHI(Brain Heart Infusion) a partir de un cultivo en agar sólido, que fue incubado durante 48h en estufa a 37°C.

La CMI se evaluó mediante microdilución en caldo utilizando microplacas nuevas de 96 pocillos, comercialmente estériles. Para cada extracto comercial se prepararon diluciones seriadas en las proporciones 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32 respecto del producto de partida. En los microplacas se colocó 100ul de suspensión bacteriana y 100ul de la dilucion de propoleo.

Cada producto se evaluó por triplicado. Se incluyó clorhexidina al 0,12 % como control positivo, alcohol como control negativo y caldo BHI sin bacteria como control de esterilidad. Durante la incubación, las microplacas permanecieron cubiertas con su tapa. Para disminuir la evaporación y prevenir la desecación de los pocillos experimentales, se colocó agua estéril en los pocillos periféricos que rodeaban las condiciones experimentales.

Las microplacas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Posteriormente, el crecimiento bacteriano se evaluó mediante espectrofotometría (GEA Microplate Reader), a través de la medición de la absorbancia de cada micropocillo. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó como la menor concentración del extracto de propóleo evaluada capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, de acuerdo con los valores de absorbancia obtenidos y su comparación con los controles establecidos en el ensayo.

3.5 Validez y Confiabilidad

La estandarización del procedimiento experimental se sustentó en el empleo de una cepa bacteriana de referencia (ATCC 29523), ajuste del inóculo al estándar 0,5 de McFarland, condiciones uniformes de incubación, utilización de material comercialmente estéril y aplicación de controles en los ensayos.

3.6 Procedimiento

1. Se dispusieron los 21 propóleos comerciales para registrarlos con numeración aleatorizada.
2. Se preparó el inóculo de *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523 y se ajustó al estándar 0,5 de McFarland.
3. Para la difusión en disco, el microorganismo se sembró a manera de estriado sobre agar Mueller-Hinton y se aplicaron los productos de propóleo en discos estériles de 6 mm, junto con los controles correspondientes.
4. Las placas de difusión se incubaron durante 48 horas a 37 °C en jarra de anaerobiosis y posteriormente se registraron los halos de inhibición en milímetros. Cada producto se evaluó por triplicado.
5. Para la microdilución se utilizaron microplacas nuevas de 96 pocillos, comercialmente estériles, y se prepararon para cada producto las diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32.
6. En cada ensayo se incorporaron clorhexidina al 0,12 % como control positivo, alcohol como control negativo y caldo BHI sin bacteria como control de esterilidad. Cada producto se evaluó por triplicado.
7. Las microplacas se mantuvieron cubiertas y se colocó agua estéril en pocillos periféricos para limitar la evaporación y la desecación durante la incubación.

8. Las microplacas se incubaron durante 48 horas a 37 °C y se identificó la menor dilución/concentración sin crecimiento bacteriano visible como CMI por medio de fotoespectrometría.

3.7 Consideraciones éticas

La investigación se desarrolló exclusivamente *in vitro* y no involucró participantes humanos, datos personales ni muestras biológicas de origen humano. El material microbiológico correspondió a una cepa bacteriana de referencia. En consecuencia, no se requirieron procedimientos de consentimiento informado propios de estudios en seres humanos. Durante la ejecución experimental se mantuvieron las medidas de bioseguridad y las prácticas de laboratorio correspondientes al manejo de microorganismos y material microbiológico.

3.8 Métodos de análisis de datos

Los datos obtenidos fueron organizados y procesados mediante estadística descriptiva e inferencial, de acuerdo con el tipo de ensayo microbiológico realizado. Las determinaciones experimentales se efectuaron por triplicado y los resultados se expresaron mediante media y desviación estándar (DE). Para el análisis estadístico se consideró un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

En la medición de la difusión en disco, los diámetros de los halos de inhibición, expresados en milímetros (mm), se analizaron a partir de las tres repeticiones independientes realizadas para cada uno de los 21 propóleos comerciales. Para cada producto se calculó la media y desviación estándar del diámetro del halo de inhibición.

De manera complementaria, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) a las 63 mediciones correspondientes a los 21 propóleos comerciales, con el propósito de determinar la existencia de diferencias globales entre sus diámetros medios de inhibición. La clorhexidina y

el alcohol no fueron incluidos como grupos en este análisis inferencial. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

En cuanto a la concentración mínima inhibitoria (CMI); para el ensayo de microdilución se analizaron descriptivamente los resultados obtenidos para los propóleos 2 y 4, seleccionados aleatoriamente entre los cuatro productos que presentaron los mayores diámetros medios de inhibición en el ensayo de difusión en disco. Cada producto fue evaluado por triplicado en las diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32.

Las lecturas espectrofotométricas obtenidas inmediatamente después de la inoculación y después de 48 horas de incubación fueron corregidas considerando la absorbancia basal registrada en los controles correspondientes. Para cada dilución se calculó la media y desviación estándar de la absorbancia corregida de las tres repeticiones. La interpretación del efecto inhibitorio se realizó mediante la comparación de las lecturas iniciales y finales corregidas, considerando la ausencia de incremento de absorbancia durante el periodo de incubación como compatible con inhibición del crecimiento bacteriano. La clorhexidina al 0,12 % se empleó como control positivo de inhibición, mientras que el control negativo y el control de esterilidad permitieron verificar las condiciones experimentales del ensayo.

La CMI se interpretó como la menor concentración evaluada capaz de mantener la inhibición del crecimiento detectable bajo las condiciones del ensayo. Cuando la inhibición se mantuvo hasta la mayor dilución estudiada (1/32), el resultado se expresó como $CMI \leq$ a la concentración correspondiente a la dilución 1/32, debido a que no se evaluaron diluciones posteriores.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Presentación de los resultados

4.1.1 Susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión en disco

La actividad antimicrobiana de los 21 propóleos comerciales frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* se evaluó mediante el método de difusión en disco. Cada producto fue analizado por triplicado y los resultados se expresaron como el diámetro medio del halo de inhibición y su desviación estándar, en milímetros.

Se observó variabilidad en los diámetros de inhibición entre los productos evaluados. El propóleo comercial 4 presentó el mayor diámetro medio de inhibición, con $9,96 \pm 0,92$ mm, seguido por los propóleos 18 ($9,69 \pm 0,83$ mm), 2 ($9,60 \pm 1,20$ mm) y 13 ($9,48 \pm 0,40$ mm). Estos cuatro productos presentaron los mayores valores medios de inhibición dentro del conjunto de propóleos analizados.

Los productos restantes presentaron diámetros medios comprendidos entre 6,94 y 8,87 mm, con excepción de los propóleos 20 y 21, cuyas tres repeticiones registraron un diámetro de 6,00 mm. Debido a que este valor corresponde al diámetro del disco utilizado en el ensayo, ambos productos fueron considerados sin halo de inhibición adicional detectable.

Como control positivo, la clorhexidina al 0,12 % presentó diámetros de inhibición de , 15,02 y 14,44 mm, correspondientes a una media de $15,11 \pm 0,72$ mm. Por su parte, el control negativo con alcohol presentó un diámetro de 6,00 mm en todas las repeticiones, equivalente al diámetro del disco y, por consiguiente, sin inhibición adicional detectable.

Los resultados obtenidos evidenciaron que 19 de los 21 extractos comerciales de propóleo presentaron algún grado de inhibición detectable por encima del diámetro del disco, mientras que dos productos no mostraron inhibición adicional.

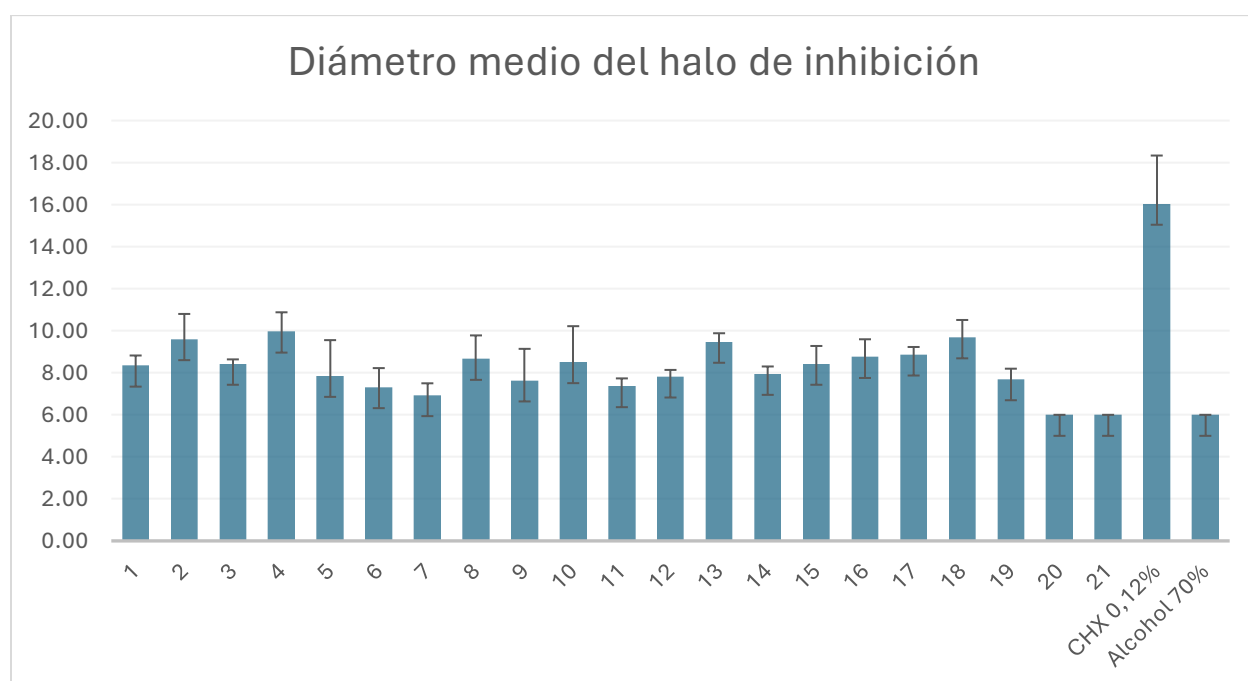
Tabla 1. Diámetro del halo de inhibición frente a *A. actinomycetemcomitans*

Propóleo	Prueba 1 (mm)	Prueba 2 (mm)	Prueba 3 (mm)	Media (mm)	DE (mm)
1	8,14	7,99	8,89	8,34	0,48
2	9,60	8,40	10,80	9,60	1,20
3	8,19	8,55	8,55	8,43	0,21
4	9,26	9,62	11,00	9,96	0,92
5	9,34	6,00	8,22	7,85	1,70
6	8,36	6,85	6,74	7,32	0,91
7	7,40	7,10	6,31	6,94	0,56
8	9,95	8,01	8,03	8,66	1,11
9	8,95	6,00	7,96	7,64	1,50
10	10,48	7,44	7,60	8,51	1,71
11	7,15	7,79	7,15	7,36	0,37
12	7,54	7,77	8,16	7,82	0,31
13	9,01	9,69	9,73	9,48	0,40
14	7,55	8,10	8,20	7,95	0,35
15	7,48	9,10	8,71	8,43	0,85
16	7,90	9,58	8,78	8,75	0,84
17	8,56	9,26	8,79	8,87	0,36
18	9,80	10,45	8,81	9,69	0,83
19	7,45	8,27	7,36	7,69	0,50
20	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00
21	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00

Clorhexidina	15,02	15,87	14,44	15,11	0,72
0,12 %					
Alcohol	6,00	6,00	6,00	6,00	0,00

DE(Desviación estándar)

Figura 1. Diámetro del halo de inhibición frente a *A. actinomycetemcomitans*



CHX (Clorhexidina 0,12%)

De manera complementaria al análisis descriptivo, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar la existencia de diferencias globales entre los diámetros de inhibición obtenidos para los 21 propóleos comerciales.

El ANOVA de una vía mostró diferencias globales estadísticamente significativas entre los diámetros de inhibición de los 21 propóleos comerciales evaluados ($F(20,42) = 4,66$; $p <$

0,001). Este resultado indica que los propóleos presentaron un comportamiento inhibitorio diferente frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tabla 2. Análisis de varianza de los halos de inhibición

Análisis	F	gl	p	Resultado
ANOVA de una vía	4,66	20; 42	< 0,001	Diferencias globales significativas

4.1.2 Determinación de la mínima concentración inhibitoria mediante microdilución en caldo

Para la determinación del MIC se seleccionaron aleatoriamente dos de los cuatro propóleos que presentaron los mayores diámetros medios de inhibición mediante difusión en disco, correspondiendo a los propóleos 2 y 4. Ambos productos fueron evaluados por triplicado en diluciones seriadas de 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32.

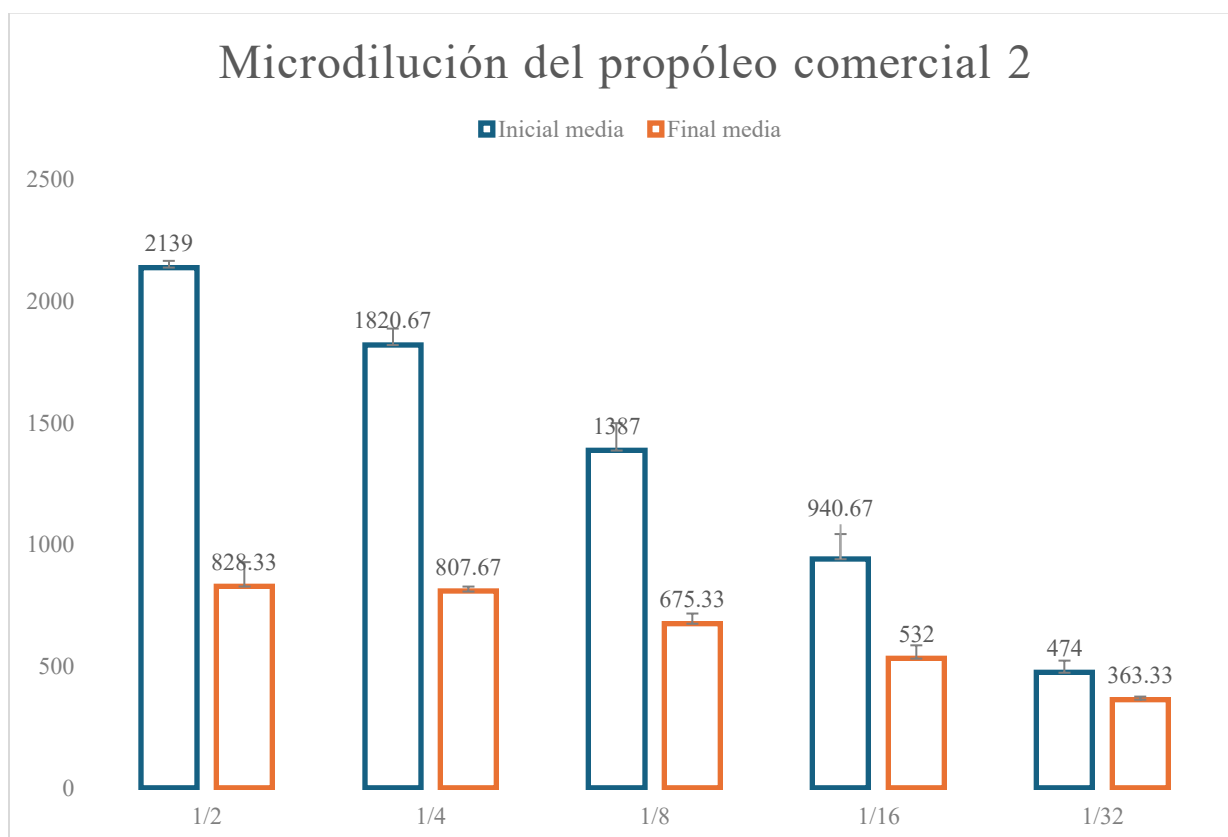
Las lecturas espectrofotométricas fueron corregidas mediante la sustracción del valor correspondiente al control de esterilidad y se analizaron mediante estadística descriptiva, expresándose como media $\pm$ desviación estándar. En ambos propóleos se observó una disminución de la absorbancia final respecto a la lectura inicial en todas las diluciones evaluadas.

Propóleo	Dilución	Absorbancia inicial corregida (media $\pm$ DE)	Absorbancia final corregida (media $\pm$ DE)	Interpretación
2	1/2	2139,00 $\pm$ 26,63	828,33 $\pm$ 99,14	Inhibición
2	1/4	1820,67 $\pm$ 66,67	807,67 $\pm$ 19,43	Inhibición
2	1/8	1387,00 $\pm$ 111,73	675,33 $\pm$ 41,06	Inhibición
2	1/16	940,67 $\pm$ 102,26	532,00 $\pm$ 53,69	Inhibición

2	1/32	474,00 ± 48,82	363,33 ± 11,59	Inhibición; CMI ≤ 1/32*
---	------	----------------	----------------	-------------------------

Tabla 3. Resultados de estadística descriptiva del propóleo comercial 2

Figura 2. Gráfico de disminución de la turbidez para el propóleo 2

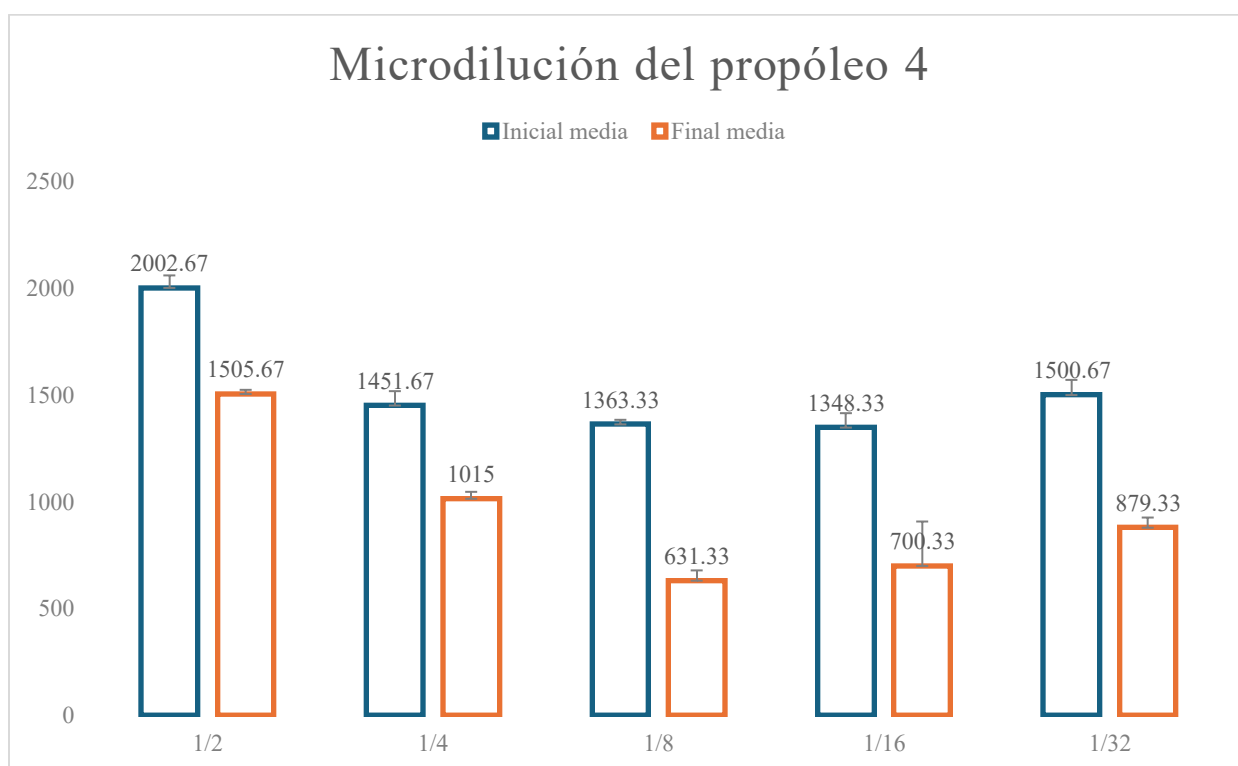


Propóleo	Dilución	Absorbancia inicial corregida (media ± DE)	Absorbancia final corregida (media ± DE)	Interpretación
4	1/2	2002,67 ± 57,64	1505,67 ± 18,56	Inhibición

4	1/4	1451,67 ± 66,52	1015,00 ± 31,43	Inhibición
4	1/8	1363,33 ± 20,50	631,33 ± 47,08	Inhibición
4	1/16	1348,33 ± 66,56	700,33 ± 207,02	Inhibición
4	1/32	1500,67 ± 70,16	879,33 ± 46,70	Inhibición; CMI ≤ 1/32*

Tabla 4. Resultados de estadística descriptiva del propóleo comercial 4

Figura 2. Gráfico de disminución de la turbidez para el propóleo 2



Nota. Los valores corresponden a media ± desviación estándar de tres repeticiones. Las absorbancias fueron corregidas mediante la sustracción del control de esterilidad correspondiente a cada repetición. Se consideró ausencia de incremento de la absorbancia corregida durante la

incubación como criterio operacional compatible con inhibición del crecimiento. La clorhexidina al 0,12 % se empleó como control positivo de inhibición.

* **CMI $\leq$ 1/32**: la inhibición persistió hasta la mayor dilución evaluada; por ello, el experimento no permite determinar una CMI exacta inferior a esa concentración. No escribiría simplemente “**CMI = 1/32**”, porque no ensayaron 1/64, 1/128, etc.

4.2 Discusión

Los resultados obtenidos evidenciaron que los propóleos comerciales presentaron una actividad antimicrobiana variable frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. En la prueba de difusión en disco, los propóleos 4, 18, 2 y 13 mostraron los mayores diámetros medios de inhibición, con valores comprendidos entre 9,48 y 9,96 mm, mientras que los propóleos 20 y 21 registraron 6,00 mm, valor correspondiente únicamente al diámetro del disco y, por tanto, sin inhibición adicional detectable. Esta variabilidad también fue respaldada por el análisis global entre los 21 productos, lo que indica que los propóleos comerciales no presentaron un comportamiento antimicrobiano uniforme frente al microorganismo evaluado.

Este hallazgo coincide con lo descrito por Al-Ani et al. (2018), quienes demostraron que propóleos procedentes de diferentes regiones europeas presentaban diferencias importantes tanto en su composición química como en su actividad antimicrobiana. Los autores identificaron más de cien compuestos fitoquímicos y observaron variaciones en las concentraciones inhibitorias mínimas de acuerdo con el origen de las muestras, lo que confirma que la actividad antimicrobiana del propóleo puede estar condicionada por sus características particulares y no únicamente por su denominación como producto natural (AL-Ani et al., 2018). De manera similar, (Sa-Eed et al., 2023) encontraron una respuesta antimicrobiana heterogénea al estudiar propóleos procedentes de distintas regiones de Ghana. Algunos productos mostraron actividad frente a determinados microorganismos, mientras otros presentaron una respuesta mínima o

ausente, y la actividad también varió según la fracción obtenida y el solvente empleado. Aunque las bacterias analizadas por estos autores fueron distintas de *A. actinomycetemcomitans*, sus resultados respaldan la interpretación de que la actividad antimicrobiana del propóleo depende tanto de las características propias del producto como del microorganismo frente al cual se evalúa.

La variabilidad observada entre los 21 propóleos comerciales puede relacionarse, al menos parcialmente, con la naturaleza química compleja del propóleo. Su composición depende del origen botánico y geográfico, de las resinas disponibles para las abejas y de los procesos posteriores de obtención y formulación. Al-Ani et al. identificaron diferencias en contenido fenólico, flavonoides y otros compuestos entre propóleos de distintos orígenes, acompañadas de diferencias en su comportamiento antimicrobiano. Estos antecedentes permiten plantear que las diferencias encontradas entre los productos evaluados podrían estar relacionadas con variaciones en su composición química, concentración y procesamiento. Sin embargo, debido a que no se realizó una caracterización fitoquímica individual de los 21 propóleos comerciales, no es posible atribuir la mayor o menor actividad observada a un compuesto específico.

Esta interpretación adquiere especial importancia al considerar los resultados reportados por Srinivas et al. (2022), quienes evaluaron propóleo específicamente frente a *A. actinomycetemcomitans* y demostraron actividad antibacteriana mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria. El estudio comparó preparaciones de propóleo con diferente composición y encontró que la respuesta antimicrobiana podía variar según la preparación evaluada, asociándose además con diferencias en el contenido de fenoles y flavonoides. Esta coincidencia con los resultados obtenidos refuerza la posibilidad de que la variabilidad química

de los propóleos comerciales contribuya a explicar por qué algunos productos presentaron halos de inhibición mayores que otros.

En relación con la difusión en disco, los mayores halos correspondieron al propóleo 4 con $9,96 \pm 0,92$ mm, seguido del propóleo 18 con $9,69 \pm 0,83$ mm, el propóleo 2 con $9,60 \pm 1,20$ mm y el propóleo 13 con $9,48 \pm 0,40$ mm. Estos valores indican una actividad inhibitoria detectable, aunque de magnitud moderada. Un antecedente particularmente relevante es el estudio de (Surgery & Mahdi, 2015), en el que se evaluó propóleo frente a *A. actinomycetemcomitans* mediante difusión en agar. Los autores encontraron halos variables en función de la concentración y del tipo de preparación, con valores que aumentaron progresivamente al incrementar la concentración del propóleo. Los resultados previamente revisados para esta investigación muestran halos aproximados entre 8,6 y 16,2 mm, dependiendo de las condiciones experimentales.

Los diámetros obtenidos para los propóleos de mayor actividad se encuentran dentro del intervalo inferior descrito por Mahdi et al.; sin embargo, esta comparación debe interpretarse de manera descriptiva. Las diferencias en el método de difusión, concentración utilizada, cantidad de producto aplicada y características propias de cada preparación impiden establecer una equivalencia cuantitativa directa entre ambos estudios. Precisamente, una de las características de las pruebas de difusión es que el diámetro del halo no depende exclusivamente de la actividad antimicrobiana, sino también de la capacidad de los componentes para difundirse a través del medio de cultivo. En consecuencia, dos productos con actividad biológica pueden generar diámetros diferentes debido a sus propiedades fisicoquímicas y no necesariamente porque uno carezca de actividad antimicrobiana. Esta consideración también ayuda a explicar la dispersión observada entre los diferentes propóleos comerciales evaluados.

La existencia de productos que no mostraron inhibición adicional, como los propóleos 20 y 21, también encuentra respaldo en la literatura. Los antecedentes no demuestran que todos los propóleos sean necesariamente eficaces frente a *A. actinomycetemcomitans*. Estudios previos han descrito diferencias importantes en susceptibilidad bacteriana según el origen y preparación del propóleo. En este contexto, el hallazgo de productos con actividad claramente detectable junto a otros sin actividad observable constituye un aporte relevante, ya que evidencia que no es apropiado asumir que todos los propóleos comerciales poseen el mismo potencial antimicrobiano.

La clorhexidina al 0,12 % produjo un halo medio de $16,04 \pm 2,29$ mm, superior al observado en los propóleos comerciales de mayor actividad. Este comportamiento es coherente con su función como control positivo y confirma que las condiciones experimentales permitieron detectar una respuesta inhibitoria frente a *A. actinomycetemcomitans*. Akca et al. (2016) compararon propóleo y clorhexidina frente a diversos microorganismos orales, incluyendo *A. actinomycetemcomitans*, y demostraron que ambos agentes presentaban actividad antimicrobiana tanto sobre células planctónicas como en modelos de biopelícula, aunque la magnitud del efecto variaba según el microorganismo y las condiciones evaluadas.

Por lo tanto, el mayor halo producido por la clorhexidina no debe interpretarse como ausencia de actividad de los propóleos comerciales, sino como una diferencia en la magnitud del efecto bajo las condiciones experimentales utilizadas. Asimismo, la clorhexidina cumple la función de control positivo de inhibición, pero no constituye un valor numérico de corte que los propóleos deban igualar para considerarse activos. Este aspecto es relevante para interpretar tanto los resultados de difusión como los obtenidos mediante microdilución.

En la segunda fase experimental, los propóleos 2 y 4 fueron seleccionados aleatoriamente entre los cuatro productos que habían presentado los mayores diámetros medios de inhibición. Durante el ensayo de microdilución, ambos mostraron una disminución de la absorbancia corregida final con respecto a la lectura inicial en todas las diluciones estudiadas, desde 1/2 hasta 1/32. Este comportamiento es compatible con un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano dentro del intervalo experimental evaluado y complementa los resultados obtenidos mediante difusión en disco.

Los resultados presentan concordancia con Srinivas et al. (2022), quienes también demostraron actividad inhibitoria del propóleo frente a *A. actinomycetemcomitans* mediante determinación de CMI. Del mismo modo, (Khodijah et al., 2017) analizaron el efecto del propóleo frente a *A. actinomycetemcomitans* mediante espectrofotometría y recuento de unidades formadoras de colonias, encontrando una respuesta dependiente de la concentración y estableciendo valores de concentración mínima inhibitoria y bactericida. En conjunto, estos antecedentes coinciden en que el propóleo puede ejercer actividad inhibitoria frente a este periodontopatógeno; sin embargo, las concentraciones informadas no deben compararse directamente con las diluciones 1/2–1/32 empleadas en el presente estudio, debido a diferencias en la formulación, unidades de concentración, cepas, métodos de preparación y criterios utilizados para determinar la inhibición.

El hecho de que los propóleos 2 y 4 mantuvieran un comportamiento compatible con inhibición hasta la mayor dilución evaluada sugiere que su actividad antimicrobiana persistió dentro del rango experimental estudiado. No obstante, debido a que 1/32 fue la mayor dilución analizada, no es posible establecer con precisión si la inhibición hubiera continuado en diluciones superiores. Además, las características ópticas propias de los propóleos comerciales

pueden influir en las mediciones espectrofotométricas, por lo que la interpretación de la CMI debe realizarse con cautela. En este sentido, los resultados permiten afirmar que existió actividad inhibitoria dentro del intervalo evaluado, pero no establecer una concentración inhibitoria absoluta fuera de dicho rango.

Esta precaución también es consistente con estudios recientes sobre propóleo y microorganismos orales. Investigaciones realizadas con diferentes propóleos comerciales han demostrado valores de MIC variables incluso cuando se utilizan microorganismos orales relacionados con enfermedad periodontal, lo que vuelve a poner de manifiesto que la concentración inhibitoria depende de las características particulares del producto. Un estudio publicado en 2021, por ejemplo, encontró diferencias en las MIC de propóleos brasileños y europeos frente a varias especies orales y señaló que la procedencia del propóleo influía en la actividad antimicrobiana y antibiofilm (Stähli et al., 2021). Aunque sus condiciones no son directamente equivalentes a las utilizadas frente a *A. actinomycetemcomitans* en esta investigación, estos resultados apoyan la interpretación de que no existe una CMI universal aplicable a todos los propóleos.

En conjunto, los resultados obtenidos coinciden con los antecedentes que reconocen al propóleo como un producto con potencial actividad antimicrobiana frente a microorganismos de importancia oral y, específicamente, frente a *A. actinomycetemcomitans*. Al mismo tiempo, las diferencias observadas entre los 21 propóleos comerciales confirman que dicha actividad no se presenta de manera uniforme. La comparación con estudios previos sugiere que factores relacionados con la composición química, origen, concentración, formulación y características metodológicas pueden modificar considerablemente la magnitud del efecto observado.

El principal aporte de estos hallazgos radica en demostrar que la susceptibilidad de *A. actinomycetemcomitans* frente a propóleos comerciales puede variar sustancialmente entre productos, aun cuando todos sean comercializados bajo una misma denominación general. Por tanto, los resultados obtenidos con un propóleo específico no deberían extrapolarse automáticamente a cualquier otro producto comercial. Esta variabilidad refuerza la necesidad de que futuras investigaciones incorporen la caracterización química de los productos, expresen las concentraciones finales en unidades comparables y evalúen un intervalo más amplio de diluciones, con el propósito de relacionar con mayor precisión la composición del propóleo con su actividad antimicrobiana.

Finalmente, aunque los resultados respaldan el potencial antimicrobiano *in vitro* de determinados propóleos comerciales frente a *A. actinomycetemcomitans*, estos hallazgos no permiten inferir directamente eficacia clínica. Las condiciones experimentales *in vitro* no reproducen completamente factores presentes en la cavidad oral, como la formación de biopelículas polimicrobianas, la interacción con saliva y tejidos, ni la disponibilidad real de los compuestos activos. Por esta razón, los resultados deben considerarse como evidencia experimental inicial que contribuye al conocimiento sobre la actividad de los propóleos comerciales y proporciona una base para investigaciones posteriores de caracterización química, estandarización y evaluación preclínica.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y PROPUESTA

5.1 Conclusiones

La presente investigación permitió determinar que los propóleos comerciales pueden presentar actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, microorganismo relacionado con el desarrollo y progresión de determinadas formas de

enfermedad periodontal. Sin embargo, la respuesta observada no fue uniforme entre los productos evaluados, lo que permite concluir que la actividad antimicrobiana atribuida al propóleo no debe asumirse como una característica constante o equivalente para todas las formulaciones disponibles comercialmente.

La evaluación mediante difusión en disco permitió establecer que existen diferencias en la capacidad inhibitoria de los propóleos comerciales frente a *A. actinomycetemcomitans*. La presencia de productos con diferente comportamiento frente a un mismo microorganismo constituye uno de los principales hallazgos de la investigación, debido a que evidencia la necesidad de evaluar cada producto de manera individual antes de atribuirle propiedades antimicrobianas basadas exclusivamente en su denominación como propóleo.

La evaluación mediante microdilución complementó los hallazgos obtenidos mediante difusión en disco y permitió observar actividad inhibitoria en los propóleos seleccionados dentro del intervalo experimental estudiado. La utilización conjunta de ambas metodologías permitió abordar la actividad antimicrobiana desde perspectivas complementarias: mientras la difusión en disco permitió identificar diferencias en la capacidad inhibitoria entre los productos evaluados, la microdilución permitió estudiar el comportamiento de los propóleos seleccionados frente a diluciones progresivas. No obstante, las características del diseño experimental y el límite máximo de dilución establecido determinan que las conclusiones relacionadas con la concentración mínima inhibitoria deban circunscribirse al intervalo efectivamente evaluado.

La variabilidad encontrada entre los propóleos comerciales adquiere especial relevancia al considerar la naturaleza biológica y químicamente compleja del propóleo. A diferencia de una sustancia farmacológica constituida por un principio activo definido y estandarizado, el propóleo es un producto natural cuya composición puede variar considerablemente. Su origen geográfico,

las especies vegetales disponibles en el entorno de las colmenas, las condiciones climáticas y ambientales, la época de recolección y las características propias de la producción pueden influir en la materia prima obtenida. A estos factores se suman posteriormente los procesos de extracción, formulación y concentración empleados para generar los diferentes productos comerciales.

Por esta razón, la actividad antimicrobiana identificada en determinados propóleos comerciales no debe extrapolarse automáticamente a otros productos, incluso cuando compartan una denominación o presentación semejante. Las diferencias observadas ponen de manifiesto la importancia de avanzar hacia una caracterización química y fitoquímica individual de los propóleos, que permita conocer con mayor precisión su composición y relacionarla posteriormente con su actividad biológica.

En este sentido, una de las principales proyecciones derivadas de la investigación consiste en complementar la evaluación microbiológica con la identificación y cuantificación de los componentes bioactivos presentes en los productos que demuestren actividad antimicrobiana. La determinación del contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y otros constituyentes de interés permitiría establecer si existen perfiles químicos asociados con una mayor actividad frente a *A. actinomycetemcomitans*. Asimismo, la comparación de productos procedentes de diferentes regiones podría contribuir a comprender en qué medida las características botánicas, geográficas y ambientales se relacionan con las diferencias en su composición y comportamiento antimicrobiano.

Estos factores constituyen explicaciones científicamente plausibles y relevantes para investigaciones posteriores, pero requieren ser evaluados experimentalmente antes de establecer relaciones causales. En consecuencia, uno de los aportes del estudio consiste precisamente en

evidenciar una variabilidad biológica que justifica profundizar posteriormente en las características particulares de los productos.

La inclusión de la clorhexidina al 0,12 % como control positivo permitió disponer de un referente antimicrobiano reconocido para verificar el comportamiento del sistema experimental. Su incorporación no tuvo como finalidad demostrar equivalencia entre el propóleo y la clorhexidina ni establecer una competencia terapéutica entre ambos agentes, sino proporcionar un control de inhibición frente al cual interpretar adecuadamente el funcionamiento de los ensayos realizados.

Este aspecto resulta particularmente importante al establecer las implicaciones de los hallazgos. La actividad antimicrobiana identificada en determinados propóleos comerciales no constituye evidencia suficiente para plantearlos como sustitutos de la clorhexidina, ni permite recomendar su utilización clínica para reemplazar antimicrobianos actualmente empleados en el manejo odontológico. La clorhexidina continúa constituyendo un agente antiséptico de referencia ampliamente utilizado en el control químico de la placa bacteriana, mientras que los resultados obtenidos con propóleo corresponden a un modelo experimental *in vitro* y representan una etapa inicial dentro de un proceso de investigación mucho más amplio.

Por tanto, el interés científico de los resultados no radica en proponer un reemplazo inmediato de los tratamientos existentes, sino en abrir una línea de investigación sobre productos naturales con potencial antimicrobiano. La identificación de actividad frente a un microorganismo de importancia periodontal permite considerar al propóleo como un candidato para estudios posteriores orientados a determinar su composición, estandarización, mecanismos de acción, seguridad biológica y comportamiento en sistemas experimentales de mayor complejidad.

De igual manera, cualquier posible aplicación futura requeriría superar progresivamente diferentes etapas de investigación. La demostración de actividad antimicrobiana *in vitro* constituye únicamente una primera aproximación y debe complementarse con estudios de citotoxicidad y biocompatibilidad, evaluación frente a biopelículas y comunidades microbianas más complejas, determinación de formulaciones y concentraciones estandarizadas y, posteriormente, estudios preclínicos y clínicos que permitan establecer su seguridad y eficacia. Solo después de contar con evidencia suficiente en estas etapas sería posible valorar una eventual aplicación odontológica.

Desde esta perspectiva, los propóleos comerciales con actividad antimicrobiana podrían ser considerados en el futuro no necesariamente como sustitutos de los agentes convencionales, sino como posibles fuentes de compuestos bioactivos o como punto de partida para el desarrollo de estrategias coadyuvantes, siempre que investigaciones posteriores demuestren de manera consistente su composición, actividad, seguridad y reproducibilidad. Esta interpretación permite reconocer el potencial científico del propóleo sin atribuirle propiedades terapéuticas que excedan la evidencia obtenida en el presente estudio.

Otro aspecto relevante es la necesidad de estandarización. La variabilidad observada demuestra que estudiar el propóleo únicamente como una categoría general puede resultar insuficiente. Para generar evidencia comparable entre investigaciones será necesario caracterizar los productos evaluados, establecer con precisión sus concentraciones, identificar su procedencia cuando sea posible y utilizar metodologías microbiológicas reproducibles. La estandarización permitiría distinguir con mayor claridad qué características de determinados propóleos se relacionan con su actividad antimicrobiana y facilitaría la comparación de resultados entre diferentes estudios.

En respuesta a la pregunta de investigación y en concordancia con los objetivos planteados, se concluye que los propóleos comerciales evaluados poseen un comportamiento antimicrobiano variable frente a *A. actinomycetemcomitans* bajo condiciones *in vitro*. Esta variabilidad constituye un elemento central del estudio, ya que demuestra que la actividad observada en un producto específico no debe generalizarse al propóleo como una entidad homogénea. La evaluación individual, la caracterización química y la estandarización constituyen, por tanto, aspectos fundamentales para avanzar en el conocimiento de su potencial antimicrobiano.

En conclusión, los hallazgos obtenidos aportan evidencia experimental que amplía el conocimiento sobre la interacción entre los propóleos comerciales y *A. actinomycetemcomitans* y, al mismo tiempo, generan nuevas interrogantes relacionadas con las características responsables de las diferencias encontradas. Más que establecer una alternativa terapéutica definitiva, esta investigación proporciona una base experimental para continuar explorando de manera sistemática y rigurosa el potencial de determinados propóleos comerciales, manteniendo como principio que cualquier futura aplicación deberá sustentarse en procesos de caracterización, estandarización y validación científica antes de ser trasladada al ámbito clínico.

5.2 Recomendaciones

A partir de los hallazgos obtenidos, se recomienda continuar la investigación de los propóleos comerciales mediante estudios que permitan profundizar en las causas de la variabilidad observada en su actividad antimicrobiana frente a *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Debido a que los productos evaluados no mostraron un comportamiento uniforme, futuras investigaciones deberían considerar al propóleo como un producto biológico de composición variable y evitar generalizar los resultados obtenidos con una formulación específica hacia otros productos comerciales.

Una de las principales recomendaciones consiste en incorporar la caracterización química y fitoquímica de los propóleos comerciales. La identificación y cuantificación de sus principales componentes permitiría establecer posibles relaciones entre su composición y la actividad antimicrobiana observada. Particularmente, sería pertinente analizar compuestos fenólicos, flavonoides y otros componentes bioactivos de interés, así como comparar los perfiles químicos de productos con diferente comportamiento antimicrobiano. De esta manera, futuras investigaciones podrían determinar si determinadas características químicas se relacionan de forma consistente con una mayor actividad frente a *A. actinomycetemcomitans*.

Asimismo, se recomienda considerar, cuando sea posible, información relacionada con el origen geográfico y botánico del propóleo, debido a que las características de la vegetación disponible para las abejas, las condiciones ambientales, el clima y la época de recolección pueden relacionarse con variaciones en la composición de la materia prima. La incorporación de estas variables, acompañada de una caracterización química, permitiría comprender con mayor precisión las diferencias entre productos y contribuiría a establecer criterios de estandarización.

En relación con la evaluación microbiológica, futuras investigaciones deberían ampliar el intervalo de concentraciones o diluciones utilizadas en la microdilución. Particularmente, cuando la actividad inhibitoria se mantenga hasta la mayor dilución evaluada, resulta conveniente continuar con diluciones sucesivas que permitan delimitar con mayor precisión el punto de inhibición. También se recomienda expresar las concentraciones finales mediante unidades estandarizadas, lo que facilitaría la reproducibilidad del procedimiento y la comparación de los resultados con otros estudios.

Se recomienda además avanzar progresivamente hacia modelos experimentales de mayor complejidad. Una vez identificados y caracterizados los propóleos con comportamiento

antimicrobiano consistente, podrían evaluarse frente a biopelículas de *A. actinomycetemcomitans* y posteriormente en modelos polimicrobianos que representen de manera más aproximada las condiciones microbiológicas del ambiente periodontal. Estas investigaciones permitirían establecer si la actividad identificada frente a microorganismos en condiciones *in vitro* se conserva en sistemas biológicos más complejos.

De igual manera, antes de considerar cualquier posible aplicación odontológica, deberán realizarse estudios de citotoxicidad y biocompatibilidad, debido a que la presencia de actividad antimicrobiana no demuestra por sí misma que un producto sea seguro para los tejidos orales. Posteriormente, y únicamente si existe evidencia preclínica suficiente, podrían plantearse investigaciones clínicas dirigidas a evaluar seguridad, tolerabilidad y eficacia.

Finalmente, se recomienda interpretar los hallazgos obtenidos como una base para nuevas investigaciones y no como evidencia para sustituir la clorhexidina u otros agentes antimicrobianos de uso establecido. La clorhexidina continúa constituyendo un referente antimicrobiano en odontología y su inclusión en investigaciones posteriores resulta pertinente como control positivo. El interés del propóleo debería orientarse inicialmente hacia la identificación y estandarización de productos o componentes con potencial antimicrobiano y hacia la evaluación de su posible función futura como coadyuvantes, siempre condicionada a la generación de evidencia científica suficiente.

Referencias Bibliográficas

Agarwal, G., Vemanaradhya, G., & Mehta, D. (2012). Evaluation of chemical composition and efficacy of Chinese propolis extract on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 3(3), 256.
<https://doi.org/10.4103/0976-237X.103614>

- Akca, A. E., Akca, G., Topçu, F. T., Macit, E., Pıkdöken, L., & Özgen, I. Ş. (2016). The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Research International*, 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/3627463>
- AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.3390/medicines5010002>
- Alvear, M., Santos, E., Cabezas, F., Pérez-SanMartín, A., Lespinasse, M., & Veloz, J. (2021). Geographic Area of Collection Determines the Chemical Composition and Antimicrobial Potential of Three Extracts of Chilean Propolis. *Plants*, 10(8), 1543. <https://doi.org/10.3390/plants10081543>
- Figueiredo, L. C., Figueiredo, N. F., Cruz, D. F. da, Baccelli, G. T., Sarachini, G. E., Bueno, M. R., Feres, M., & Bueno-Silva, B. (2022a). Propolis, Aloe Vera, Green Tea, Cranberry, Calendula, Myrrha and Salvia Properties against Periodontal Microorganisms. In *Microorganisms* (Vol. 10, Number 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112172>
- Gebara, E. C. E., Lima, L. A., & Mayer, M. P. A. (2002). Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(4). <https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000400018>
- Hbib, A., Bouziane, A., Lyoussi, B., Zouhdi, M., & Benazza, D. (2022). Aggregatibacter actinomycetemcomitans: From Basic to Advanced Research. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1373, 45–67. https://doi.org/10.1007/978-3-030-96881-6_3

- Hudzicki Jan. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology (ASM)*. <https://asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test>
- Khodijah, K., Farida, R., & Soedarsono, N. (2017). The effect of propolis extract and propolis candies on the growth of *aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(Special Issue October), 26–29. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10s5.23086>
- Kurek-Górecka, A., Keskin, Ş., Bobis, O., Felitti, R., Górecki, M., Otręba, M., Stojko, J., Olczyk, P., Kolayli, S., & Rzepecka-Stojko, A. (2022). Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. *Plants*, 11(9), 1203. <https://doi.org/10.3390/plants11091203>
- López-Valverde, N., Pardal-Peláez, B., López-Valverde, A., Flores-Fraile, J., Herrero-Hernández, S., Macedo-de-Sousa, B., Herrero-Payo, J., & Ramírez, J. M. (2021). Effectiveness of Propolis in the Treatment of Periodontal Disease: Updated Systematic Review with Meta-Analysis. *Antioxidants*, 10(2), 269. <https://doi.org/10.3390/antiox10020269>
- Miranda, S. L. F., Damasceno, J. T., Faveri, M., Figueiredo, L., da Silva, H. D., Alencar, S. M. de A., Rosalen, P. L., Feres, M., & Bueno-Silva, B. (2019). Brazilian red propolis reduces orange-complex periodontopathogens growing in multispecies biofilms. *Biofouling*, 35(3), 308–319. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1598976>
- Nader, R. A., Mackieh, R., Wehbe, R., El Obeid, D., Sabatier, J. M., & Fajloun, Z. (2021). Beehive Products as Antibacterial Agents: A Review. *Antibiotics*, 10(6), 717. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060717>

- Naranjo, A. (2019). PREVALENCIA DE ENFERMEDAD PERIODONTAL EN ESCOLARES DE 12 AÑOS DE CHIQUINTAD CUENCA (Azuay, Ecuador). *Odontología Activa Revista Científica*, 4(1), 1–6. <https://doi.org/10.31984/oactiva.v4i1.290>
- Sa-Eed, A., Donkor, E. S., Arhin, R. E., Tetteh-Quarcoo, P. B., Attah, S. K., Kabotso, D. E. K., Kotey, F. C. N., & Dayie, N. T. K. D. (2023). In vitro antimicrobial activity of crude propolis extracts and fractions. *FEMS Microbes*, 4. <https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad010>
- Santos, F. A., Bastos, E. M. A. F., Maia, A. B. R. A., Uzeda, M., Carvalho, M. A. R., Farias, L. M., & Moreira, E. S. A. (2003). Brazilian Propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytotherapy Research*, 17(3), 285–289. <https://doi.org/10.1002/ptr.1117>
- Srinivas, S., Ravi, M. B., Ram, K., Jaishankar Homberhalli, H., Nagaraja, M. S., Gowrav, M. P., & Ramesh, K. (2022). Antibacterial Efficacy of Hubballi Propolis against *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* One of the Major Causative Organisms of Perimplantitis: An In vitro Study. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 14(Suppl 1), S595–S599. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_653_21
- Stähli, A., Schröter, H., Bullitta, S., Serralutzu, F., Dore, A., Nietzsche, S., Milia, E., Sculean, A., & Eick, S. (2021). In vitro activity of propolis on oral microorganisms and biofilms. *Antibiotics*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091045>
- Surgery, M., & Mahdi, S. S. (2015). Antibacterial effect Antibacterial Effect of Aqueous and Alcoholic Propolis Extracts on *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* in Patients with Chronic Periodontitis (An In-vitro Study). In *J Bagh College Dentistry* (Vol. 27, Number 4).

World Health Organization. (2025). *Oral health*. World Health Organization.

<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>