

EFFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO SOBRE LOS MICROORGANISMOS *Streptococcus mutans* Y *Cándida albicans* QUE COLONIZAN LA CAVIDAD ORAL EN PACIENTES ADULTOS DE LA CLINICA ODONTOLOGICA, UNA PUNO – 2016

INHIBITORY EFFECT OF THE PROPOLIS EXTRACT ON THE MICROORGANISMS *Streptococcus mutans* AND *Candida albicans* THAT COLONIZE ORAL CAVITY IN ADULT PATIENTS OF THE ODONTOLOGICAL CLINIC, UNA PUNO – 2016

Tania Ramírez Arenas, Mayda Nidia Vilcapaza Condori.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de Propóleo sobre los microorganismos de *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* que colonizan la cavidad oral de pacientes adultos de la Clínica Odontológica de la Universidad Nacional del altiplano Puno, teniendo un diseño de estudio experimental, racional, de tipo prospectivo, transversal. Empleando un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia. Se inició con la obtención de la extracto etanólico de Propóleo. Las cepas de *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* fueron aisladas de muestras de pacientes con caries dentales activas y portadores de prótesis. Los microorganismos ya mencionados se expusieron a distintas concentraciones de extracto de propóleo de 25%, 50%, 75%, 100 %, durante 24 horas para determinar el efecto inhibitorio utilizando el método de Kirby Bauer.

Teniendo como resultado que el halo inhibitorio para *Streptococcus mutans* es a partir todas las concentraciones, empezando del 25 % con un halo de inhibición de 7.5 mm, al 50% con 10.5 mm, al 75% con 11.7 mm y al 100% con 14.25 mm; mientras que para *Cándida albicans* el halo de inhibición es a partir de la concentración de 50% con 6.95 mm, al 75% con 8.6 mm y al 100% con 11.8 mm. Se concluye que el propóleo etanólico a mayores concentraciones presenta mayor actividad inhibitoria para el *Streptococcus mutans* y en menor efecto inhibitorio sobre *Cándida albicans*.

PALABRAS CLAVE: Efecto inhibitorio, *Streptococcus mutans*, *Cándida albicans*, Propóleo.

ABSTRACT

The objective of the present study was to determine the inhibitory effect of the ethanolic extract of Propolis on the microorganisms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* that colonize the oral cavity of adult patients of the Dentistry Clinic of the National University of the Puno highlands, having an experimental study design, Rational, prospective, transversal type. Using a non-probability type of sampling for convenience. It began with the obtaining of the ethanolic extract of Propóleo. Strains of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* were isolated from samples of patients with active dental caries and denture wearers. The aforementioned microorganisms were exposed to different concentrations of 25%, 50%, 75%, 100% propolis extract for 24 hours to determine the inhibitory effect using the Kirby Bauer method.

With the result that the inhibitory halo for *Streptococcus mutans* is from all concentrations, starting from 25% with an inhibition halo of 7.5 mm, 50% with 10.5 mm, 75% with 11.7 mm and 100% with 14.25 mm; While for *Candida albicans* the inhibition halo is from 50% concentration with 6.95 mm, 75% with 8.6 mm and 100% with 11.8 mm. It is concluded that ethanolic propolis at higher concentrations presents greater inhibitory activity for *Streptococcus mutans* and less inhibitory effect on *Candida albicans*.

KEYWORDS: Inhibitory effect, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, Propolis.

INTRODUCCION

La caries dental es una enfermedad del sistema estomatognático con mayor prevalencia en la población mundial, por lo que constituye uno de los mayores problemas de salud pública. La caries es una entidad patológica, infecciosa, crónica, progresiva y transmisible, de origen multifactorial,^{15, 17} que es producida por la acción de microorganismos de la placa bacteriana, los cuales por su metabolismo producen ácido, especialmente por la fermentación de hidratos de carbono, originando la desmineralización gradual del esmalte seguida de la destrucción proteolítica rápida de la estructura dental, hasta llegar a la pérdida total del diente.^{14,18} Los principales microorganismos de la placa bacteriana implicados en el inicio y desarrollo de la caries son: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.* y *Actinomyces sp.*^{1, 16, 19}

El *Streptococcus mutans* presenta diferentes características que son determinantes en su cariogenicidad,⁴ que son muy importantes en la colonización y mantenimiento de esta bacteria sobre el diente; posee elementos que determinan

fenómenos de adhesión, agregación y congregación; la producción y metabolización de polisacáridos intracelulares, lo que le permite obtener energía y producir ácido durante largos períodos de tiempo; rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos; poder acidógeno, acidófilo y acidúrico; también puede conseguir un pH crítico para la desmineralización del esmalte de manera más rápida que otro microorganismo de la placa.^{2,4}

La candidiasis es la más común de las infecciones micóticas orales causadas por *Cándida*, un microorganismo obligado en humanos y constituyente normal de la flora del tracto digestivo y vaginal.^{3, 21} Diversos estudios han demostrado que la infección ocurre por invasión tisular, ya sea por introducción de un estado hipersensitivo o por producción de una potente toxina.²⁰ Existen factores predisponentes para la aparición de la candidiasis que incluyen la malnutrición, infecciones concurrentes, tratamiento con antibióticos e inmunosupresores, alteraciones sistémicas como resultado de una inmunodepresión y factores locales

como prótesis mal ajustadas y maceraciones crónicas.^{3, 22}

Con el advenimiento de nuevas técnicas bacteriológicas, surgió la necesidad de crear nuevos y más confiables tratamientos dentro de los cuales, en diversos estudios, el gluconato de clorhexidina presenta mejores resultados en su capacidad de inhibir el crecimiento de *Streptococcus Mutans*, pero con el inconveniente de producir efectos tóxicos locales como: tinción de dientes y obturaciones, pigmentación del dorso de la lengua y con menor frecuencia, descamación de la mucosa bucal, gusto amargo o modificación gustativa, sensación de quemadura, sequedad bucal e inflamación ocasional y transitoria de la parótida.⁴

En este sentido, la medicina tradicional, trata de buscar alternativas de solución a enfermedades bucales, con productos apícolas, económicos y prácticos.²³ Dentro de estos productos, encontramos diversos estudios con propóleo que es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa,^{6,7} que las abejas recolectan de los árboles y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y

protección de su colmena.⁵ El Propóleo es una sustancia resinosa que las abejas *Apis mellifera* adultas producen para garantizar la total asepsia de la colmena.^{24, 26, 27, 28} Donde entre sus efectos cabe destacar: efecto antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, analgésico, cicatrizante, estimulando y favoreciendo la regeneración tisular, sobre un importante número de microorganismos. Asimismo, algunos estudios ponen de manifiesto una gran susceptibilidad de ciertos patógenos a la acción del propóleo, esta actividad depende de su procedencia y de la especie bacteriana evaluada.^{25, 29}

El presente estudio se realizó in vitro, para determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de Propóleo a diferentes concentraciones, sobre las cepas de *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans*; de ahí que existe una gama de estudios que comprueban su acción antimicrobiana, atribuyendo dicho efecto a la presencia de principios activos como los flavonoides, flavononas.^{30, 31, 32}

De acuerdo con los resultados obtenidos, este estudio servirá como una alternativa, que beneficie a la población peruana en

especial de bajos recursos económicos, además de eso presenta menos efectos adversos y es de fácil acceso para la preservación de la salud bucal, así como establecer una base en la futura elaboración de un producto aplicable en la práctica odontológica, empleando como en este caso un recurso abundante en nuestro país

MATERIALES Y METODOS

Esta investigación fue experimental, racional, de tipo prospectivo, transversal, orientada hacia la evaluación del comportamiento de *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* bajo diferentes concentraciones del extracto de Propóleo. Las muestras fueron obtenidas de pacientes que acudieron a la clínica odontológica de la UNA Puno. Y se analizó en 40 placas

Petri.

Obtención del extracto etanólico de propóleo: el propóleo fue extraído de la región de Sandía-Perú, con la ayuda de un especialista con experiencia en la recolección de este recurso natural. Se recolectaron 100 gr y se procedió a envasarlo para evitar la contaminación durante el transporte hacia el laboratorio.

Para el procesamiento del EEP: se seleccionaron aquellos que no presenten impurezas, luego fue cortado en trozos pequeños y fue macerado durante 15 días con alcohol etílico al 96% a una temperatura de 37°C; luego se decantó y filtró varias veces con papel filtro Whatman N° 4, se prepararon los extractos etanólico al 25%, 50%, 75%, 100%. Todo este proceso fue llevado a cabo en el laboratorio orión.

Procedimiento de recolección de muestras: para la recolección de saliva y dentina previa aceptación del consentimiento informado del paciente, se solicitó que depositen saliva dentro de un recipiente estéril rotulado. Y para las muestras de dentina se extrajo con una cureta de dentina N° 57 estéril y se colocó en medio de transporte de biolitos. Las muestras obtenidas se trasladaron refrigeradas al laboratorio ORION (4°C), para su inmediato procesamiento microbiológico.

Procedimiento microbiológico: El cultivo de las cepas se realizó en el laboratorio bajo la supervisión de un microbiólogo. Posteriormente se realizó la siembra selectiva mediante las técnicas de hisopado sobre los medios de cultivo respectivos.¹⁴

- Agar Sangre: *Streptococcus mutans*
- Agar Dextrosa Sabouraud: *Cándida albicans*

Además se prepararon 40 placas con 25 ml de Agar Miuller Himtom en donde se colocó los disco de sensibilidad de papel filtro Whatman N°4, los cuales fueron embebidos con 20 µl de las diferentes concentraciones del EEP, y como pruebas de control positivo se utilizaron discos de papel filtro embebido en clorhexidina al 0.12% para *Streptococcus mutans* y fluconazol para *Cándida albicans*, para el enfrentamiento bacteriano en los medios de cultivo. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas, la actividad antimicrobiana fue determinada por la inhibición del halo inhibitorio alrededor de los discos, medida mediante una regla Vernier, el cual nos determinó la cantidad en milímetros del diámetro del halo de inhibición.

Los datos fueron registrados mediante una ficha de recolección de datos.

Consideraciones éticas. La información recolectada fue manejada de manera confidencial por el investigador, así como su publicación y presentación de datos se efectuó en forma anónima, no se provocó daño epidemiológico

Análisis estadístico: La información recolectada se procesó mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión en español de Windows. Utilizando además una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2007 para la representación gráfica correspondiente. La prueba estadística ANOVA, es el análisis de varianza que nos ayuda a determinar diferencias significativas de una misma solución a diferentes concentraciones. La representación gráfica fue expresada en gráficos de líneas, mientras que el análisis de datos se presentó en tablas en forma numérica y porcentual de acuerdo a las variables de estudio. Para conocer si la muestra tenía distribución normal se utilizó la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Al analizar la acción antibacteriana del propóleo contra el *Streptococcus mutan*, se encontró que las medias de cada población son distintas, para el propóleo de 25%, 50%, 75%, y 100% las medias de halo de inhibición fueron de 7,5 mm, 10,5 mm, 11,7 mm y 14,25 mm respectivamente, y la media del grupo control, clorhexidina, tuvo una media de

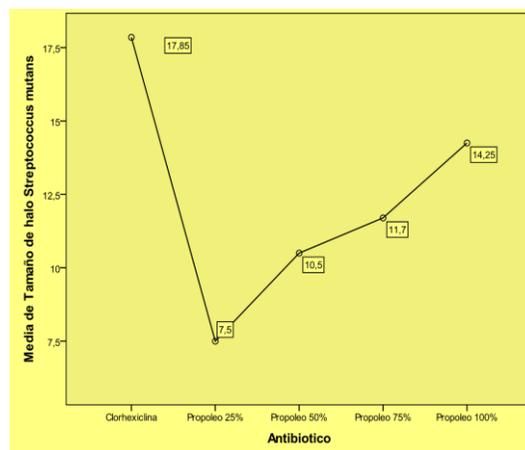
halo de inhibición de 17.85 mm. Nos señala que todas las concentraciones de propóleo mostraron diferencia significativa ($P = 0.000 < \alpha 0.05$) (**Gráfico N° 1**).

Al analizar la acción antibacteriana del propóleo contra el *Cándida albicans*, se encontró que las medias de cada población son distintas, para el propóleo de 25%, 50%, 75%, y 100% las medias de halo de inhibición fueron de 6,10 mm, 6,95 mm, 8,6 mm y 11,85 mm respectivamente, y la media del grupo control, fluconazol, tuvo una media de halos de inhibición de 16 mm. Nos señala que todas las concentraciones de propóleo mostraron diferencia significativa ($P = 0.000 < \alpha 0.05$) (**Gráfico N° 2**).

Comparando las medias del tamaño de halo de inhibición del extracto de propóleo a las diferentes concentraciones frente a *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* resulta que las medias de cada grupo aparecen dispersos a diferentes niveles; sobre todo la media del grupo definido por los grupos control Clorhexidina y Fluconazol las cuales tienen 17,85 mm y 16,80 mm que representan los grupos con mayores halos

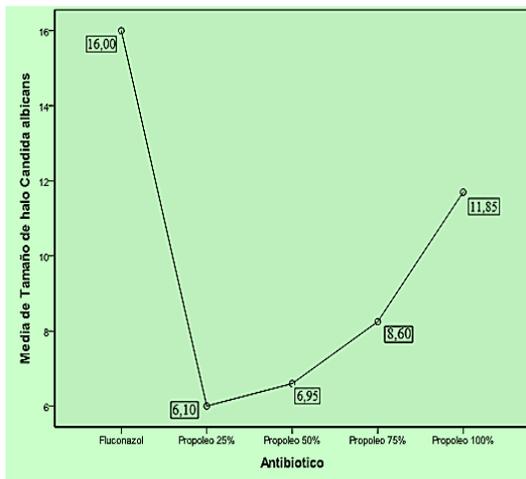
de inhibición. Las medias de cada población aparentan ser distintas, el propóleo a la concentración del 100% tuvo mayor efecto antibacteriano con un halo de inhibición de 14,25 mm, mientras que el propóleo al 100% tuvo menor efecto antifungico con un halo de inhibición de 11,85 mm. Concluyendo que el propóleo al 100% tiene mejores resultados como bacteriostático que antifungico. Esto nos señala que el resultado es significativo, y por lo tanto concluimos que las medias de las poblaciones son distintas ($P = 0.000 < \alpha 0.05$) (**Gráfico N° 3**).

Gráfico N° 1: Medias de tamaño de halo de inhibición del extracto de propóleo a las concentración de 25%, 50%, 75%, 100% frente a *Streptococcus mutans* que colonizan la cavidad oral



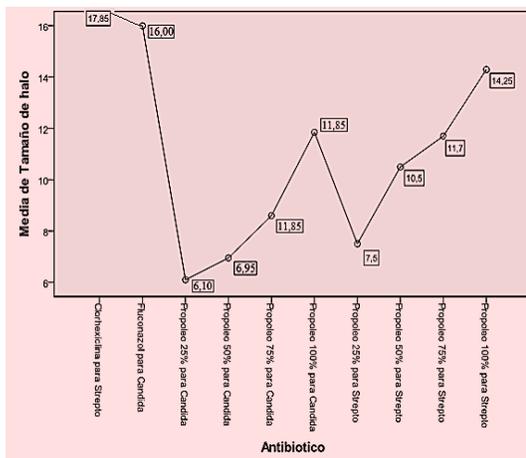
Fuente: investigadores

Gráfico N° 2: Medias de tamaño de halo de inhibición del extracto de propóleo a las concentración de 25%, 50%, 75%, 100% frente a *Cándida albicans* que colonizan la cavidad oral.



Fuente: investigadores

Gráfico N° 3: Medias de tamaño de halo de inhibición del extracto de propóleo a las concentración de 25%, 50%, 75%, 100% frente a *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* que colonizan la cavidad oral.



Fuente: investigadores

DISCUSIÓN

El estudio de productos apícolas con fines terapéuticos en Odontología se ha incrementado en la actualidad, en su mayoría destinados a controlar o eliminar un agente causal de la caries dental como es el *Streptococcus mutans*, y *Cándida albicans* como el primer agente causal de la candidiasis oral.

Mayta y col. en el 2009 evaluaron la actividad antibacteriana del propóleo, sobre la superficie bacteriana, para luego medir los halos de inhibición, concluyendo que el extracto etanólico de propóleo al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano frente al *Streptococcus mutans* con un halo de inhibición de 11,57 mm.¹¹ Lo que difiere con los resultados obtenidos en esta investigación en la cual el extracto etanólico de propóleo a la concentración de 100% tuvo mayor efectividad antibacteriana con un halo de inhibición de 14, 25 mm, por lo que existe diferencia significativa.

En el estudio de Jara R. (2014). Se comparó el efecto antibacteriano de cuatro marcas comerciales de propóleo y un extracto metanólico de Propóleo de

Oxapampa donde el extracto metanólico de Propóleo elaborado en el laboratorio tiene mayor actividad antibacteriana que los extractos comerciales frente a las cepas *Streptococcus mutans* con una media de 33.15 mm.¹⁰ Lo que difiere con nuestra investigación ya que se obtuvo un halo de inhibición de 14,25 mm con la concentración máxima, puede ser que se deba al solvente utilizado que fue el alcohol etílico en lugar de metílico. Otro factor el lugar de donde se extrajo el propóleo, siendo este, un factor determinante en la composición del propóleo.

Por otra parte Bolla y col. en el 2012 compararon la eficacia de una pasta dental, clorhexidina y propóleos como medicamentos de conducto radicular contra *Cándida albicans* donde concluye que el Propóleo muestra una eficacia parcial antifúngica.^{8,9} Los resultados son similares a nuestra investigación, encontrando como resultado una mínima actividad antifúngica. Mientras que García y col. en el 2014, determinaron que los EEP al 20% tuvieron actividad antifungica sobre *C. albicans* mientras que al 30% y 40% tuvieron actividad fungicida frente al *C. albicans*,¹⁰ también

concuera con la investigación de León y col. (2014) que evaluaron el efecto antifúngico in vitro sobre el crecimiento en *cándida albicans*, *cándida glabrata* y *cándida krusei*, expuestas al extracto etanólico de Oxapampa, con una concentración mínima inhibitoria de 12 mg/ml al 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %, que presentaron inhibición completa en el crecimiento in vitro contra las cepas de *Cándida albicans*, e inhibición parcial en el crecimiento de los otros tipos Cándida. En nuestro estudio la concentración máxima de extracto de propóleo al 100% fue el que ejerció mayor efecto antimicótico frente a *Cándida albicans* con un promedio de halo de inhibición de 11.85 mm. Hallando una diferencia significativa.

Así mismo al igual que la investigación De la Cruz (2013), donde indicó que la actividad antimicótica del extracto etanólico de Propóleo sobre el crecimiento in vitro de *Cándida albicans* fue aumentando conforme aumentaba la concentración siendo la concentración del 100% la de mayor efecto antimicótico, pero este no fue superior al medicamento sintético Nistatina utilizado como referencia.¹³ Se puede decir que se

obtuvieron resultados similares a las mismas concentraciones del extracto etanólico de propóleo, presentando halos de inhibición desde la concentración de 50%, 75%, 100%, con un promedio de 6.95 mm, 8.60 mm, 11.85 mm de halos de inhibición respectivamente, pero este no fue superior al grupo control positivo fluconazol que tuvo un halo de inhibición promedio de 16 mm.

De esta manera, los resultados evidencian que el propóleo podría constituir, después de mayores estudios, un agente importante en el control de la caries y de la candidiasis oral, que son las patologías más comunes, que se presentan en la cavidad bucal de un adulto parcialmente desdentado.

Finalmente esta investigación nos permite demostrar que debemos tener en cuenta que la composición química del propóleo es heterogénea y depende de la vegetación que predomina alrededor de la colmena, la estación del año, así como de su origen geográfico. Y esta sería una de las causas que el Propóleo de las colmenas de la provincia de Sandia departamento de Puno en Perú,³³ tenga un rango de inhibición diferente a los extractos de

propóleos de otros lugares como Oxapampa, Trujillo, Lima hasta países como India y Venezuela.

CONCLUSIONES

Los extractos de Propóleo presentan un efecto inhibitorio sobre la cepa de *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* de modo que puede ser usado como un agente en el control de la caries dental y candidiasis oral.

El extracto de propóleo frente a *Streptococcus mutans* en la concentración de 25% y 50% posee un efecto inhibitorio bajo, al 75% posee un efecto inhibitorio mediano y al 100% posee un efecto inhibitorio relativamente alto con un halo de inhibición de 14,85 mm. Por lo tanto se concluye que, a mayores concentraciones de extracto de propóleo, presenta mejor efecto inhibitorio frente a *Streptococcus mutans*.

El extracto de propóleo frente a *Cándida albicans* en la concentración de 25% y 50% posee un efecto inhibitorio menor, mientras que al 75% y 100% posee un efecto inhibitorio mediano, por lo tanto se concluye que a mayores concentraciones

de extracto de propóleo, presenta mejor efecto inhibitorio frente a *Cándida albicans*.

Comparando el efecto inhibitorio del propóleo entre *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* a las diferentes concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, el extracto de propóleo tiene mayor efecto antibacteriano que antifúngico.

RECOMENDACIONES

Se recomienda que repitan y amplíen esta experiencia, debido a que en el presente trabajo se realizó in vitro y puedan aplicarlo directamente en personas o animales.(In vivo) para la prevención de caries dental y poder elaborar un producto.

Se debería recomendar a los pacientes el uso de productos apícolas, como el propóleo, ya que resulta efectivo, barato y de fácil acceso.

Realizar estudios de investigación con otros microorganismos específicos tomados de pacientes que acudieran a la clínica estomatológica la UNA-Puno y

que sean causantes de afecciones medico estomatológicas.

Se recomienda tomar en cuenta los diferentes factores que tal vez puedan estar interviniendo en el bajo efecto inhibitorio, y que en este presente trabajo no se tuvieron en cuenta.

A la escuela profesional de Odontología, se le recomienda tomar en cuenta los diferentes estudios realizados con las nuevas alternativas de la medicina natural e incorporar en la currícula de estudios.

REFERENCIAS

1. Fontana, M.; Young, D. A.; Wolff, M. S.; Pitts, N. B. & Longbottom, C. Defining dental caries for 2010 and beyond. Rev. Dent. Clin. North Am. 2010: Vol. 54(3):423-40.
2. Negroni, M. Microbiología Estomatológica. 2da ed. Buenos Aires: Ed. Medica panamericana; 2009.
3. Polsigua T. Antibioticoterapia en el manejo de las patologías de los tejidos blandos de la cavidad bucal. [Tesis]. Universidad de Guayaquil; 2014.

4. Alvarez P. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (theobroma cacao L.) Sobre cepa de Streptococcus mutans. Estudio in vitro.[Tesis].Quito: Universidad Central de Ecuador; 2015
5. Farre R Frasquet I, Sanchez A. El propolis y la Salud. Ars Pharmaceutica. 2004; 45(1): 21-43.
6. Carrillo M, Castillo L, Rosalba M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina. Inf. Tecnológica. 2011; vol. 22(5): 21-28.
7. Madhubala M, Srinivasan N, Ahamed S. Comparative Evaluation of Propolis and Triantibiotic Mixture as an Intracanal Medicament against Enterococcus faecalis. Rev. J Endod. 2011; vol. 37(9): 1287-9.
8. Odontología-online.com [Internet]. La Habana: Odontologia-online; 2014 [actualizado 14 Feb 2014; citado 19 mayo 2016]. Disponible en: <http://www.odontologia-online.com/publicaciones/endodoncia/3051-efectividad-del-propoleos-como-irrigante-en-la-terapia-endodontica-policlinico-13-de-marzo-habana-del-este-2010-2011.html>
9. Bolla N, Kavuri S, Tanniru H, Vemuri S, Shenoy A. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of odontopaste, chlorhexidine and propolis as root canal medicaments against Enterococcus Faecalis and Candida Albicans. Int Dent J. [Internet]. 2012 [citado 17 may 2016]; 5(1): 14-25. Disponible en: <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/intdent/article/viewFile/5000053045/5000050370>
10. García A. Ucar A., Ballester L. Eliminación de Candida albicans con Extracto Etanólico de Propóleo comercial de apis mellifera del estado Mérida, en bases de Prótesis Parciales Removibles. Rev. Odont de los Andes. 2014; vol. 9 (1): 4-14.
11. Mayta Tovalino F, Sacsquispe Contreras SJ. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanolico de propoleo de Oxapampa-Perú sobre cultivos de Streptococcus mutans CATCC 25175 y Staphylococcus aureus CATCC 25923. Rev Estomatol hered. 2010; vol. 20 (1): 19-24.

12. Calderon A. Actividad antimicrobiana in vitro de soluciones de propóleo etanolico sobre bacterias periodontopatogenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal. Hospital Militar Central, Lima 2010. [Tesis]. Puno: UNA; 2010.
13. De la Cruz L. Actividad antimicótica del extracto etanolico de propoleo sobre el crecimiento in vitro de candida albicans.[Tesis] Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
14. León G, Sacsquispe S, Zurita S. Efecto antifúngico in vitro sobre el crecimiento en candida albicans ATTC 90028, candida glabrata ATCC 90030 y candida krusei atcc 6258 expuestas al propóleos de oxapampa a las 24, 48 y 120 horas. Rev. Investigación de la Univ. Norbert Wiener [Internet]. 2014 [citado 20 may 2016]; vol. 3(1): 23-29.
15. Jara R. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Streptococcus sanguinis (ATCC 10556). [Tesis]. Lima: UPC; 2014.
16. Espinoza M, León R., Prevalencia y experiencia de caries dental en estudiantes según facultades de una universidad particular peruana. Rev estomatol herediana. 2015; Vol. 25(3): 187-198.
17. Alegría A, Prevalencia de caries dental en niños de 6-12 años de edad atendidos en la clínica pediátrica de la Universidad Alas peruanas utilizando los criterios ICDAS II. [Tesis]. Peru: Universidad Alas Peruanas; 2010.
18. Henostroza G. Caries dental: Principios y procedimientos para el diagnóstico. Primera Edición. Perú: Editorial Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2007.
19. Centurión K. Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanólico de Caesalpinia spinosa (tara) frente a Streptococcus mutans ATCC 35668. [Tesis de maestria]. Trujillo: UPAO; 2015
20. Liébana U. Microbiología oral. 2da ed. España: Editorial Mc Graw Hill; 1995
21. Marsh P. Microbiología oral. 5ta edición. Venezuela: editorial AMOLCA; 2011

22. Ceccotti E. El diagnóstico en clínica estomatológica. 1ra edición. Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2007.
23. García K. Efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia sinensis* (té verde) usada como colutorio sobre placa bacteriana y saliva. *Rev. Pueblo cont.* 2013; vol. 24(2): 349-356.
24. Gil M, Perelli A, Alvarado R, Arias Y, Blumenthal E. Actividad bacteriostática de la tintura de propoleo sobre bacterias enteropatógenas. *Rev. Salud De la facultad de ciencias de la salud de la Universidad de Carabobo.* 2012; Vol. 16(3):21-25.
25. Premoli G, Laguado P, Diaz N, Romero C, Villareal J, Gonzales A. Uso del propoleo en Odontología. *Rev. Odontologica Venezolana.* 2009; Vol. 48(2):1-13.
26. Bedascarrasbure, E., Maldo, L., & Alvarez, A. Propóleos: Un Valioso Producto de la Colmena. *Horizonte Agroalimentario* [Rev. En línea] 2011 [consultado el 26 de septiembre de 2016]; Vol 1 (4). Disponible en : <http://inta.gob.ar/documentos/propol>
27. España: Slideshare; [página principal en internet]. Cuba: Nicolas Alzaga; c2011 [Actualizado 2011 Agosto 3; citado 28 sep 2016]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/aloverasanta/nder/el-propoleo>
28. Angulo Vaca, J. B. Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la empresa apicare - riobamba. [Tesis]. Riobamba-Ecuador: escuela superior politécnica de Chimborazo; 2014
29. Solorzano D. Estudio comparativo in vitro sobre el efecto antibacteriano del extracto de propoleo, paramonoclorofenol alcanforado e hidróxido de calcio en necrosis pulpar. Huanuco 2011. [Tesis]. Universidad de Huánuco; 2011
30. Chaillou L. Estudio del propóleos de Santiago del estéreo, Argentina. *Cienc tecnol. Aliment campinas.* 2004. 24(1): 011- 015.
31. Vázquez J. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola i - cuenca del salado,

- pcia. de Buenos Aires. [Tesis doctoral]. Valencia; 2010
32. Vallejo V. Evaluación Antibacteriana In Vitro Del Extracto Etanólico De Propóleo Ecuatoriano al 10, 20 Y 30 %, En colonizadores primarios del Biofilm Dental. 2015. [Tesis], Universidad Central del Ecuador; 2015.
33. Wikipedia enciclopedia libre.com [Internet]. San Francisco (California): Wikipedia; 2016.[actualizada el 30 de Octubre del 2016; citado 4 de Nov. Del 2016]. Disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Puno>