



Universidad de Valparaíso
Facultad de Odontología
Escuela de Odontología
Cátedra de Periodoncia

“Actividad antimicrobiana in vivo de un extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% contra bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica”

**Trabajo de Investigación
Requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista**

Alumnos: Cristian Antonio Barraza Carmona
José Luis San Martín Chávez
Olivia Andrea Tapia Duhalde

Docente Guía: Dra. María Magdalena Pérez Vallejo

Docente Colaborador: Dr. Jorge Torres M.

Valparaíso-Chile
2006

“A mi Padres, por su amor y comprensión”.
“A mi familia, por todo su apoyo”.
“A Claudia, por todo lo que significa en mi vida”.
“A mi amigos...los de hoy, los de ayer, los de siempre”.

Cristian

“A mis Padres por todo el apoyo, comprensión y cariño que me han entregado durante toda mi vida para la realización de gran parte de mis sueños”

“A mis Tías Lucy y Nena por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera”

“A mi Rosita por todo el cariño que me he entregado a lo largo de mi existencia”

“A mi hermana por todo el apoyo y cariño que siempre me ha dado en esos momentos difíciles”

“A la Vivi que ha llegado en esta nueva etapa de mi vida”

“A todos mis amigos de universidad y fuera de ella que me han soportado en esos momentos de ira y han compartido junto a mí los momentos de felicidad”

José Luis

“A mis Padres por todo el amor que me han entregado y por apoyarme siempre, permitiéndome cumplir mis sueños”.

“A Alvarito por llegar a mí vida y llenarla de alegrías, por entenderme y estar siempre junto a mí”.

“A mis amigos por permitirme compartir grandes momentos juntos y contar siempre con su apoyo”.

Andrea

AGRADECIMIENTOS

- A nuestra docente Guía Dra. María Magdalena Pérez por creer en Nosotros, brindarnos su apoyo y dedicación.
- Al Dr. Jorge Torres por su orientación y el tiempo dedicado a nuestra investigación.
- Al Dr. Osvaldo Badenier por su aporte estadístico y guía en el desarrollo de este Seminario.
- A la Srta. Edith Carmona por su importante participación en el análisis estadístico de nuestra Tesis.
- A los Bibliotecólogos de la Facultad de Odontología por su buena disposición en la búsqueda bibliográfica.
- A Don Antonio del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina por su contribución y disposición en la etapa experimental de este Seminario.
- A los voluntarios que participaron en el estudio por su cooperación y buena voluntad.
- A la Madre de Nuestra docente Guía por su hospitalidad y atención.
- A todos los que de una u otra forma nos ayudaron a hacer realidad este Seminario de Tesis

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Microbiología Oral	5
Microbiología Salival	7
La Saliva	9
Composición	9
Funciones de la saliva	9
Propiedades del Biofilm Dental	11
Clasificación	11
Control Químico de la Placa Bacteriana	17
Evaluación de las sustancias y productos químicos	20
Clorhexidina	23
Propóleo	25
HIPÓTESIS	33
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
<i>Criterios de Inclusión</i>	35
<i>Criterios de exclusión</i>	35
RESULTADOS	39
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	57
SUGERENCIAS	58
RESUMEN	59
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	67
1.- Consentimiento Informado para participar en la etapa clínica del Seminario de Tesis para optar al título de Cirujano Dentista	67
2.- Composición de medios de transporte y de cultivo para anaerobios	68
3.- Fotos tesis	69

INTRODUCCIÓN

Durante milenios la única medicina que conoció nuestra cultura occidental fue la natural y sólo prácticamente en nuestros días se conoce la medicina catalogada como alopática, basada en fármacos químicos no siempre inocuos y que muchas veces acarrearán efectos secundarios indeseables. Los resultados de ésta medicina química han sido realmente espectaculares y beneficiosos, lo que hizo que la medicina natural fuera cayendo en desuso a lo largo de los siglos XIX y XX. Pero, los efectos secundarios de la medicina alopática y los cada vez menos efectivos antimicrobianos químicos, entre otros motivos debido a un uso abusivo e indebido de los mismos, han hecho que las personas vuelvan sus ojos nuevamente a la medicina naturista. Algunas de las técnicas y procedimientos considerados como medicina alternativa son tan antiguos como la humanidad misma, en tanto que otros constituyen puntos de partida para recientes investigaciones científicas.

Como futuros Odontólogos, miembros de un Equipo de Salud Integral, surge la inquietud de conocer, aplicar y dar sustento científico al uso de sustancias naturales que podrían contribuir significativamente en nuestro campo, respaldando la visión actual de medicina integrativa.

Dentro de la amplia gama de productos considerados naturales, se destaca al Propóleo, una sustancia colectada por las abejas, usada como material para proteger y conservar la colmena, al cual se le atribuyen múltiples propiedades biológicas tales como: antimicrobiano, antifúngico, cicatrizante, antiinflamatorio, entre otras, siendo algunas de ellas usadas como base de estudios científicos que actualmente se están desarrollando en todo el mundo, por lo que resulta interesante estudiar su aplicación en un campo específico del área Odontológica: la Periodoncia.

Considerando que el factor etiológico principal de las enfermedades periodontales es el biofilm dental, parece interesante estudiar la capacidad antibacteriana del Propóleo contra bacterias que habitan en la boca de pacientes que padecen Periodontitis Crónica. Para ello se trabajará con la saliva, que corresponde a un ecosistema oral en donde se encuentran bacterias provenientes de otros nichos ecológicos de la cavidad bucal como el saco periodontal de pacientes con dicha enfermedad. Además, la saliva constituye un fluido de fácil recolección, que contiene microorganismos representativos de ésta enfermedad.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de éste compuesto natural, se decidió utilizar como parámetro la Clorhexidina, considerada actualmente el agente antimicrobiano más eficaz para controlar el biofilm dental y que es utilizada como control positivo con la cual son comparados todos los otros agentes antiplaca.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Para una mejor comprensión de los términos utilizados en ésta tesis, se definirán los siguientes conceptos:

1. **Medicina Alternativa:** Conjunto diverso de sistemas, prácticas y productos médicos y de atención en salud que se utiliza en lugar de la medicina convencional (OMS, 2005).
2. **Medicina Complementaria:** Conjunto diverso de sistemas, prácticas y productos médicos y de atención en salud que se utilizan conjuntamente con la medicina convencional (OMS, 2005).
3. **Medicina Homeopática:** Medicina que combate las enfermedades con remedios administrados en dosis mínimas, y consistentes en sustancias que producen efectos semejantes a los síntomas de la enfermedad que se desea combatir, con lo cual se activa la respuesta metabólica (OMS, 2005).
4. **Medicina Integrativa:** Combinación de las terapias médicas formales y terapias de medicina complementaria y alternativas, para las cuales existen datos científicos de alta calidad sobre su seguridad y eficacia (OMS, 2005).
5. **Medicina Naturista :** Es la parte de la medicina, de tradición hipocrática, que utiliza los elementos de la naturaleza como el aire, agua, sol, tierra, plantas (fitoterapia), así como una nutrición natural de base vegetariana para prevenir, promocionar y reparar la salud, aprovechando la “Vis Natura Medicatrix” o fuerza de la naturaleza humana para su autocuración (AEMN, 2005).
6. **Placa bacteriana:** Es una entidad bacteriana proliferante, enzimáticamente activa, que se adhiere firmemente a la superficie dentaria y que por su actividad bioquímica metabólica, ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de caries y periodonciopatías (Brown, 1991).
7. **Biofilm:** Corresponde a una población de microorganismos que se desarrollan en medio de una matriz de molécula, tanto orgánicas como inorgánicas y que se encuentra adherida a una superficie (Frías, 2001).

MARCO TEÓRICO

La medicina complementaria y alternativa tiene muchas características positivas entre las que se incluyen: diversidad y flexibilidad, accesibilidad, amplia aceptación entre muchas poblaciones de países en vía de desarrollo, aumento de la popularidad en países desarrollados, costo comparativo relativamente bajo, bajo nivel de inversión tecnológica y una creciente importancia económica (OMS, 2005).

Sin embargo, otras características de éste tipo de cuidado de la salud pueden considerarse como retos que deben superarse, entre ellos se puede incluir: los distintos grados con los que la reconocen los gobiernos, la falta de evidencia científica con respecto a la eficacia de muchas de sus terapias y problemas para asegurar su correcto uso.

La medicina complementaria y alternativa es un conjunto diverso de sistemas, prácticas y productos médicos y de atención en salud que no se considera actualmente parte de la medicina convencional. Si bien existen algunos datos científicos confundentes sobre las terapias de la medicina complementaria y alternativa, en general se trata de preguntas esenciales que aún deben responderse mediante estudios científicos bien diseñados. La lista de lo que se considera medicina complementaria y alternativa cambia continuamente, ya que una vez que se comprueba que una terapia determinada es eficaz e inocua, ésta se incorpora al tratamiento convencional de la salud (OMS, 2005).

Existen diferencias entre la medicina complementaria y la alternativa. La medicina complementaria se utiliza conjuntamente con la medicina convencional, mientras que la medicina alternativa se utiliza en lugar de la medicina convencional. La medicina integrativa combina las terapias médicas formales y terapias de medicina complementaria y alternativas, para las cuales existen datos científicos de alta calidad sobre su seguridad y eficacia (OMS, 2005).

Según el Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa de EE.UU., las terapias de medicina complementaria y alternativa se pueden clasificar en cinco categorías:

- 1.- Sistemas médicos y alternativos, entre ellos destaca la homeopatía y la naturopatía.
- 2.- Enfoque sobre la mente y el cuerpo: utiliza variadas técnicas con el fin de afianzar la capacidad de la mente para afectar la función y los síntomas corporales. Entre ellas podemos incluir la meditación, terapias que emplean soluciones creativas como el arte, la música, la danza, etc.

3.- Terapias biológicas: emplean sustancias que se encuentran en la naturaleza como hierbas, alimentos y vitaminas, y otras terapias denominadas “naturales” que aún no han sido aprobadas desde el punto de vista científico.

4.- Métodos de manipulación y basados en el cuerpo: hace énfasis en la manipulación o en el movimiento de una o más partes del cuerpo. Entre ellos destaca la quiropráctica y los masajes.

5.- Terapias sobre la base de la energía: Incluyen el empleo de campos de energías y comprenden dos tipos:

a.- Terapia del biocampo: procuran afectar los campos de energía que supuestamente rodean y penetran el cuerpo humano. Entre ellos destaca el Reiki.

b.- Terapias bioelectromagnéticas: implican el uso no convencional de campos electromagnéticos, tales como campos de impulsos, campos magnéticos o campos de corriente alterna o directa.

En nuestro país se encuentran reglamentadas las prácticas médicas alternativas mediante el decreto N° 42 del año 2004, atendiendo a la estrategia impulsada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que alienta a los gobiernos a reconocer la importante contribución que determinadas formas de medicina alternativa pueden hacer para mejorar y mantener la salud, así como integrarlas en los sistemas de salud generales desarrollando e implantando políticas y programas nacionales al respecto.

Esto surge por la necesidad de normalizar la situación de las personas que ofrecen y difunden las prácticas médicas alternativas mediante la regularización de sus conocimientos adquiridos, a través de instituciones de educación superior o a través de la autorización sanitaria correspondiente. Éste reconocimiento y regulación que ejercerá el Ministerio de Salud será gradual y de acuerdo con prioridades específicas tales como demanda poblacional, eventuales riesgos que involucran su procedimiento de administración, eficacia terapéutica, concordancia con los programas sanitarios vigentes y disponibilidad de infraestructura técnica asequible que sustente su normalización (MINSAL, 2005).

Microbiología Oral

La Microbiota oral es extraordinariamente compleja. Se ha llegado a aislar hasta 200 especies distintas en una misma cavidad oral en el transcurso del tiempo; la mayor parte tendría la característica de ser transitoria.

La cavidad oral se define como un gran ecosistema en el cual los microorganismos están relacionados entre sí y, a su vez, con los elementos abióticos del entorno en el que están inmersos.

Las distintas zonas que conforman estructuralmente ésta cavidad constituyen los llamados ecosistemas primarios (Liébana, 2002):

- Mucosa:
 - Masticatoria
 - De la unión dentogingival
 - De revestimiento
 - Especializada
- Superficies dentales (corona y cemento radicular)
- Película adquirida y placas (supra y subgingivales y radiculares)
- Materiales artificiales
- Surco gingival
- Saliva

A continuación se recogen los principales microorganismos que constituyen la microbiota oral (Liébana, 2002):

- **Cocos Gram positivos:** Con gran diferencia sobre los demás son los Streptococos del grupo Viridans, los más aislados, tanto cualitativa como cuantitativamente, de todos los ecosistemas orales. En menor proporción se hallarían Staphylococcus spp., Enterococcus spp., S. Mucilaginosus, Abiotrophia spp., y los anaerobios estrictos Peptostreptococcus spp.
- **Cocos Gram Negativos:** Se detectan diversas especies, aerobias y comensales no exigentes, del género Neisseria y otras pertenecientes al género Veillonella como anaerobias estrictas.
- **Bacilos Gram Positivos:** Numerosos bacilos Gram positivos y elementos filamentosos pleomórficos se aíslan de la cavidad oral. Destacan un número amplio de especies de los géneros Actinomyces y Lactobacillus y, en menor cantidad, Corynebacterium matruchotii, Rothia dentocariosa, especies de Propionibacterium y las pertenecientes a los géneros anaerobios Eubacterium y Bifidobacterium. Otras bacterias no bien identificadas se

incluyen habitualmente bajo el término vago e impreciso de “difteroides” o “difteromorfos”, por su forma similar a las Corinebacterias.

- **Bacilos Gram Negativos:** Destacan por su importancia los anaerobios estrictos no esporulados como *Porphyromonas* spp. , *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Leptotrichia buccalis*, *Selenomonas* spp., y las *Centipeda periodontii*. Igualmente destacan como bacterias anaerobias facultativas: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus* spp., *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* spp. Y algunas especies del genero *Campylobacter*.
- **Otros microorganismos:** Entre ellos sobresalen los *Treponemas* comensales, hongos como *Candida* spp., *Mycoplasma* spp., y los escasos protozoos aislados en la cavidad oral como las especies *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis*.

Los microorganismos existentes en la cavidad oral pueden influenciar positiva o negativamente la colonización de otras bacterias, cambiando de un medio favorable a uno desfavorable, por ejemplo por competencia de nutrientes, o destrucción de receptores. Así, la población bacteriana es el mejor limitador de la presencia de hongos en la cavidad bucal, lo cual está dado por *S. Mitis*, *lactobacilli* y otras bacterias generadoras de peróxido de hidrógeno.

También la producción de bacteriocinas por las propias bacterias pueden causar la muerte de sus vecinas o producir otros fenómenos más difundidos, como por ejemplo unas bacteriocinas producidas por *S. Mutans* inhiben la adherencia (en forma generalizada) del *A. Viscosus*.

Todos estos factores determinan que dentro de la cavidad oral existan diferentes ecosistemas, ya que todos los lugares se ven afectados por ellos en distinta proporción.

Microbiología Salival

Al carecer de Microbiota propia, todos los microorganismos presentes en la saliva tienen un carácter transitorio que depende de la composición de los otros ecosistemas primarios. En general, predominan los cocos Gram positivos anaerobios facultativos (entorno al 44%), los cocos Gram negativos anaerobios estrictos como *Veillonella* spp. (alrededor del 15%), y los bacilos anaerobios facultativos Gram positivos (aproximadamente 15%), destacando las especies de *Actinomyces* (Liébana, 2002).

La siguiente tabla muestra la distribución aproximada de microorganismos en algunos hábitat de la cavidad oral (Liébana, 2002):

Microorganismos	Áreas (%)				
	1	2	3	4	5
1. Cocos	97	67	50	67	6
1.1 Grampositivos anaerobios facultativos	95	45	37	50	5
1.2 Gramnegativos preferentemente aerobios	<1	2	2	<1	4
1.3 Grampositivos anaerobios estrictos	<1	4	<1	4	4
1.4 Gramnegativos anaerobios estrictos	1.5	16	12	13	3
					3
					1
					5
2. Bacilos	<4	33	48	32	3
2.1. Grampositivos anaerobios facultativos	<1	12	40	18	5
2.2. Grampositivos preferentemente aerobios	<1	2	<1	<1	1
2.3. Grampositivos anaerobios estrictos	<1	6	<1	3	5
2.4. Gramnegativos anaerobios facultativos	<1	5	3	6	2
2.5. Gramnegativos anaerobios estrictos	<1	8	3	5	7
					4
					7
3. Treponemas	-	<1	1	1	-

1. Mucosa oral. 2. Dorso de la lengua. 3. Placa subgingival madura. 4. Surco gingival en estado de salud periodontal. 5. Saliva

Tabla I. Distribución aproximada de microorganismos en la cavidad oral

Para un correcto análisis de la microbiota oral, las muestras recogidas deben ser representativas del ecosistema que se estudia y no contaminarse con microorganismos de zonas circundantes. Para el transporte de ellas, es imprescindible el uso de medios y sistemas apropiados, y emplear el menor tiempo posible en el envío de las muestras, siendo lo ideal que las mismas se procesen a la cabecera del paciente.

El tratamiento de la muestra debe ser apropiado; por ejemplo, en las placas deben disgregarse para separar individualmente los organismos y así facilitar su estudio, o bien hacer diluciones. En algunos casos habrá que realizar un estudio cualitativo y, en otros, cuantitativo y en ciertas ocasiones habrá que detectar una determinada especie en relación con el total de la microbiota. Ello obliga al empleo de diferentes medios de cultivo sólidos con distintos grados de selectividad, atmósfera diversa y tiempo variable de incubación. (Liébana, 2002).

En el último decenio ha aumentado el conocimiento del componente bacteriano de las infecciones periodontales. Se ha descubierto nuevas especies y los estudios clínicos han definido patógenos esenciales con demostrada importancia etiológica en el inicio y progresión de las enfermedades periodontales (Liébana, 2002).

Diferentes trabajos han demostrado desde 1980 que, si bien el área subgingival es el ecosistema primario principal de los patógenos periodontales, éstos también pueden encontrarse en otros ecosistemas, en menores cantidades y quizás de manera transitoria. Éstos ecosistemas no subgingivales pero, que alojan patógenos periodontales podrían comportarse como una fuente de reinfección (Liébana, 2002).

Debido a la peculiaridad de los ecosistemas primarios orales y, de forma especial, a la variabilidad, heterogeneidad y cantidad de la microbiota, existen numerosos problemas a la hora de conocer con exactitud su composición microbiana.

En el año 1998, Umeda et al. determinaron que la saliva es un buen sustituto para las muestras de la placa subgingival en la determinación de bacterias periodonciopáticas de la boca. (Sirinian et al., 2002). Más recientemente Mager et al. compararon la composición microbiológica de los diferentes sitios orales y observaron que la microbiota de la saliva es más similar a las muestras subgingivales que la microbiota que se deposita en la zona lateral y dorsal de la lengua (Cortelli et al., 2005).

La Saliva

Corresponde a un líquido alcalino, claro y algo viscoso, secretado por las glándulas salivales que empiezan la digestión de la comida (Genco et al., 1993). Es producida principalmente por las tres glándulas salivares mayores, que corresponden a la Parótida, la Submaxilar y la Sublingual, las cuales aportan cerca del 90% de la producción de éste fluido. El 10% restante es producido por las glándulas salivares menores de la mucosa oral. (Pedersen et al., 2003).

En un individuo sano, la producción diaria de saliva oscila entre 0.5 y 1.5 l. En condiciones normales se secreta alrededor de 0.5 ml por minuto (Guyton et al., 1996).

Hay importantes diferencias entre la composición de la saliva glandular, mixta, en reposo o estimulada, entre individuos e incluso en un mismo sujeto. Tales diferencias se acentuarán por diversos factores como el tipo de alimentación, higiene oral, enfermedades glandulares, deshidratación y otros (Liébana, 2002).

La glándula Parótida secreta una saliva serosa rica en ptialina (una alfa-amilasa), que es una enzima que interviene en la digestión de los almidones, a su vez, las glándulas Submaxilar y Sublingual producen una secreción mucosa que contiene mucina, que cumple funciones de lubricación y protección de las superficies (Guyton et al., 1996).

Composición

Cada glándula salival produce una secreción característica y compleja que consiste en electrolitos, proteínas, glucoproteínas y lípidos, cada uno de los cuales difiere significativamente del plasma (Genco et al., 1993).

En general los componentes inmunitarios y no inmunitarios de la saliva (IgA secretoria) aportan una barrera protectora inicial contra la invasión de sustancias y patógenos extraños en la cavidad bucal (Mandel, 1987).

Los constituyentes orgánicos de la saliva como el colesterol, varían entre 2,3 a 5 mg /100 ml. El contenido de urea es de 20 mg/100ml de saliva no estimulada y en la estimulada es de 13 mg/100ml. La urea se hidroliza a carbonato de amoniaco por la ureasa, lo que aumenta el poder neutralizante de la saliva (Shafer et al., 1986).

Funciones de la saliva

Las múltiples funciones de la saliva se relacionan con las características y componentes específicos de éste fluido. Dentro de sus variadas funciones podemos citar (Pedersen et al., 2003):

- Limpieza mecánica de restos de comida y bacterias
- Lubricación de las superficies orales
- Protección del diente y la mucosa oro-esofágica
- Neutralización de ácidos y dilución de detritus
- Actividad Antimicrobiana
- Dilución de componentes gustativos
- Facilitación de la fonación, masticación y deglución
- Formación del bolo alimenticio para su deglución
- Digestión inicial del almidón y lípidos

La boca es el único lugar del cuerpo en que se encuentran sólidos duros como la superficie dentaria, donde distintos organismos establecen una forma de anclaje y encuentran un favorable medio de nutrición y es debido a que hay gran flujo salival que solamente se mantienen aquellos microorganismos que pueden adherirse a la cavidad bucal (Lindhe, 2001).

La saliva actúa como receptor para la colonización bacteriana inicial lo que permite la formación de grupos organizados, los cuales dan origen a las enfermedades más frecuentes de la cavidad bucal, caries y enfermedad periodontal.

Las glucoproteínas salivales se depositan sobre el esmalte formando una película adquirida, inmediatamente después de la limpieza de las superficies dentales. La película adquirida se caracteriza por una capa orgánica acelular exenta de bacterias y sus productos, la cual alcanza un grosor de 1 a 2 micrones (Brown, 1991).

En la formación de dicha película intervienen dos mecanismos:

- **Absorción selectiva:** Las proteínas ácidas y ricas en prolina tienen una marcada afinidad hacia la hidroxiapatita adhiriéndose selectivamente a ella (Brown, 1991).
- **Degradación bacteriana:** Las bacterias de la saliva pueden hidrolizar el ácido siálico de las glucoproteínas, causando un desplazamiento del punto isoeléctrico, haciendo que sean insolubles a pH próximo a la neutralidad. Es por ello, que ocurre su precipitación fuera de la saliva y, por lo tanto, su adsorción sobre el diente. (Brown, 1991).

Una vez que se ha formado la película adquirida y en ausencia de higiene bucal comienzan a depositarse las primeras poblaciones bacterianas sobre la película dental. Ésta adherencia inicialmente es muy débil y caracterizada por la presencia de anaerobios facultativos Grampositivos, distinguiéndose a las 24 horas de su formación los estreptococos, principalmente el *Streptococcus sanguis* (Lindhe, 2001).

Posteriormente continúan los fenómenos de agregación y coagregación bacteriana y en menor grado, la adhesión de microorganismos a la película (Liébana, 1995). Las bacterias

comienzan a aumentar en número iniciando un proceso de sucesión ecológica autogénica, donde los microorganismos residentes modifican el ambiente y pueden ser sustituidos por otros más adaptados al hábitat (Liébana, 1995).

Entre los 3 a 5 días de formación de la película adquirida comienzan a predominar los bacilos y filamentos Grampositivos, particularmente los Actinomicetes. Sus superficies receptoras sirven de medio de unión para la adherencia posterior de organismos Gramnegativos como la *Veionella*, *Fusobacterias* y otras bacterias anaerobias Gramnegativas (Brown, 1991).

A las 2 o 3 semanas se constituye una placa relativamente estable cuyos principales microorganismos corresponden a cocos Grampositivos 37%, cocos Gramnegativos 14%, bacilos Grampositivos 40%, bacilos Gramnegativos 6%, espiroquetas 1% y otros 2% (Liébana, 1995).

Propiedades del Biofilm Dental

- 1.- Resistencia a los antibióticos
- 2.- Concentración de nutrientes
- 3.- Comunidades microbianas
- 4.- Poder de mineralización
- 5.- Concentración de fluoruros
- 6.- Potencial patogénico
- 7.- Producción de ácidos
- 8.- Injuria directa e indirecta

Clasificación

El biofilm dental se puede clasificar arbitrariamente, en supragingival, depositado en las coronas clínicas de los dientes, y subgingival, ubicado en el surco gingival o bolsa periodontal (Lindhe, 2001).

El biofilm supragingival es fácilmente detectable a inspección visual al alcanzar cierto grosor, lo cual ocurre a 24 – 48 horas en los sitios libres de higiene y sin remoción funcional. Se observa de color amarillo blanquecina con un grosor mayor a nivel del tercio gingival y áreas interproximales de los dientes (Brown, 1991).

Transcurrido cierto tiempo, la placa madura puede mineralizarse originando el cálculo, tártaro o sarro. El período requerido para su formación es variable y puede ir desde días hasta semanas. El cálculo dental corresponde a depósitos calcificados o calcificantes en los dientes que aparecen como agregados amarillos y blancos localizados habitualmente en las uniones dento-gingivales (Liébana, 2002).

La mineralización comienza en centros que surgen intracelularmente en las colonias bacterianas o extracelularmente de la matriz con núcleos de cristalización. El cálculo se compone de cuatro cristales diferentes de fosfato de calcio; brucita, octo fosfato de calcio, hidroxiapatita y whitlockita (Lindhe, 2001).

Dependiendo de su ubicación el cálculo lo podemos clasificar en supra y subgingival:

- **Cálculo supragingival:**

Se define como los depósitos calcificados que se encuentran adheridos con fuerza a las coronas clínicas de los dientes por encima del margen gingival (Genco et al., 1993). Es una masa de moderada dureza de color blanco cremoso a amarillo oscuro o pardo. Está constituido por capas y ofrece una gran heterogeneidad de una capa a otra con respecto al contenido mineral. Como promedio, el contenido mineral es del 37%, pero oscila entre el 16% y 51% con algunas capas con máxima densidad de minerales que llega hasta el 80% excepcionalmente (Kani et al., 1983; Friskopp y Isacson, 1984).

El grado de formación del cálculo no depende sólo de la cantidad de placa bacteriana presente, sino también de la secreción de las glándulas salivales (Lindhe, 2001).

Debido a que las secreciones salivales son la fuente principal de sales minerales, el cálculo supragingival es más abundante en las superficies linguales de los dientes anteroinferiores, opuestas a los orificios de salida de las glándulas submandibulares, así como en las superficies vestibulares de los molares superiores frente al orificio de salida de la glándula parótida.

- **Cálculo Subgingival:**

Corresponde a los depósitos calcificados que se forman en las superficies radiculares por debajo del margen gingival y que se extienden hasta el interior de la bolsa periodontal (Genco et al., 1993). Se caracteriza por ser más homogéneo, pues está compuesto por capas de la misma densidad elevada de minerales. Como promedio, la densidad es del 58% y oscila entre el 32 y el 78%. Se han encontrado valores máximos de 60 – 80% (Kani et al., 1983; Friskopp y Isacson, 1984). Los depósitos subgingivales son casi siempre de color café oscuro a verde negruzco y son más duro que el supragingival.

En la mayoría de los casos, el cálculo subgingival no se forma mediante extensión directa del supragingival sino más bien por la mineralización de la placa subgingival que se extiende o proviene de la placa supragingival (Genco et al., 1993).

Los padecimientos más frecuentes de los tejidos periodontales son los procesos inflamatorios gingivales y del aparato de inserción dental, que corresponden a infecciones microbianas relacionadas con la acumulación local de placa bacteriana, cálculos y flora periodontal patógena subgingival (Genco et al., 1993).

La enfermedad periodontal es de naturaleza infecciosa y etiología multifactorial, en donde principalmente ocurre una infección de bacterias Gram negativas en los tejidos; esta infección causa un proceso crónico con fases de reagudización (Lindhe, 2001).

La gingivitis se define como la inflamación de la gingiva en ausencia de la pérdida de inserción clínica. La Gingivitis causada por placa bacteriana es la forma más prevalente y común de las enfermedades periodontales. Se determinó que la placa bacteriana era el agente causal de la gingivitis y que la remoción mecánica de ésta devuelve un estado de salud al paciente (Lindhe, 2001).

Se caracteriza por la presencia de los siguientes signos clínicos (AAP, 2000):

- Enrojecimiento de los tejidos gingivales
- Sangramiento al sondaje
- Cambios en el contorno y consistencia de la encía
- Presencia de cálculo y/o placa
- Ausencia de evidencia radiográfica de pérdida de cresta ósea.

La gingivitis puede persistir durante años sin pérdida apreciable de inserción periodontal, destrucción del ligamento periodontal o evidencia de pérdida ósea. Ciertas personas y sitios pasan a generar una periodontitis a partir de las lesiones de gingivitis, mientras que otras se mantienen resistentes y simplemente muestran respuestas de gingivitis a los microorganismos acumulados en la placa (Rateitschak et al., 1993).

La periodontitis por definición corresponde a la inflamación de los tejidos de soporte del diente, con pérdida progresiva de inserción y de hueso, caracterizada por la formación del saco periodontal y/o recesión de la gingiva (APP, 2000).

La periodontitis crónica requiere cierta predisposición adicional del huésped como por ejemplo un defecto neutrofilico, un ataque microbiano muy intenso o una incapacidad de una respuesta inmune eficaz frente a los microorganismos de la placa. La destrucción tisular resulta entonces en una sobre-respuesta del hospedero más que la acción directa de las bacterias (Lindhe, 2001).

La American Academy of Periodontology (AAP) de 1999 ha clasificado las enfermedades periodontales de la siguiente manera:

I. Enfermedades Gingivales

A. Enfermedad gingival inducida por placa:

- Enfermedad Gingival asociada a factores locales
- Enfermedad Gingival modificada por factores sistémicos
- Enfermedad Gingival modificada por fármacos
- Enfermedad Gingival modificada por malnutrición

B. Lesiones gingivales no inducidas por placa:

- Enfermedades gingivales de origen bacteriano específico
- Enfermedades gingivales de origen viral
- Enfermedades gingivales de origen fúngico
- Lesiones gingivales de origen genético
- Manifestaciones gingivales de condiciones sistémicas
- Lesiones traumáticas
- Reacciones a cuerpos extraños
- Otras no específicas

II. Periodontitis Crónica:

- A. Localizada
- B. Generalizada

III Periodontitis Agresiva

- A. Localizada
- B. Generalizada

IV. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas

- A. Asociada con desórdenes hematológicos
- B. Asociada con desórdenes genéticos
- C. Otros no específicos

V. Enfermedad periodontal necrotizante

- A. Gingivitis ulcero necrotizante
- B. Periodontitis ulcero necrotizante

VI. Absceso Periodontal

- A. Absceso gingival
- B. Absceso periodontal
- C.- Absceso periocoronal

VII. Periodontitis asociada a lesiones endodónticas

- A. Lesiones combinadas endoperiodontales

VIII. Condiciones o deformidades del desarrollo o adquiridas

- A. Factores localizados relacionados a los dientes que modifican o predisponen a la enfermedad gingival inducida por placa o periodontitis
- B.- Condiciones y deformidades mucogingivales adyacentes a los dientes
- C.- Condiciones y deformidades mucogingivales en rebordes edéntulos
- D. Trauma oclusal

Desde el punto de vista de extensión, localizada indica que existe menos del 30% de los sitios afectados y generalizada es una cantidad mayor de 30% de sitios afectados (Rateitschak et al., 1993; Lindhe, 2001).

Desde el punto de vista de severidad ésta puede dividirse en base a la cantidad de pérdida de inserción: sea ésta individual (por sitio clínico) o por la cantidad total de pérdida ósea. De éste modo, la cantidad de pérdida de inserción clínica por sitios se subdivide en (Rateitschak et al., 1993; Lindhe, 2001):

- Incipiente (1-2 mm.)
- Moderada (3-4 mm.)
- Avanzada (más de 5 mm.)

A su vez la cantidad de pérdida de inserción total se subdivide en (Rateitschak et al., 1993; Lindhe, 2001):

- Incipiente (menor a 33% de los sitios)
- Moderada (menor al 50% de los sitios)
- Avanzada (mayor al 50% de los sitios)

Con respecto a la prevalencia de la enfermedad periodontal, aproximadamente un 48% de la población adulta de Estados Unidos presenta periodontitis crónica y porcentajes similares, o incluso más altos han sido reportados para otras poblaciones (Albandar, 2005). En Chile, Gamonal tomó una población de 1150 sujetos entre 35 – 44 años y 65 – 74 años y determinó que la prevalencia de periodontitis crónica correspondía a un 90.89% para el grupo de 35-44 años y a un 100% para el grupo de 65-74 años. La prevalencia total para ambas cohortes fue de un 92.19% (Gamonal et al., 1998).

Para poder abordar esta situación de Salud Bucal de la población, se requiere aplicar enfoques de Salud Pública basados en diagnósticos epidemiológicos, priorizados sobre grupos de alto riesgo, con medidas costo-efectivas y de alto impacto, reforzando el trabajo multidisciplinario e intersectorial, poniendo especial énfasis las acciones promocionales y preventivas (MINSAL, 2005).

En relación con la prevención de las enfermedades periodontales, el control químico del biofilm dental a través de colutorios adquiere un rol importante en la mantención de la salud bucal.

Control Químico de la Placa Bacteriana

En la actualidad se considera de vital importancia un adecuado control de placa para mantener la salud oral. Los medios de control mecánico pueden ser ayudados con los sistemas complementarios, pues aunque el paciente sea muy meticuloso, no removerá completamente su placa (Pérez et al., 2000).

Incluso pacientes bien entrenados, pueden dejar zonas de difícil acceso alrededor de dientes posteriores y/o margen gingival sin una adecuada remoción de placa (Santos, 2003). Además, un factor importante a considerar son los pacientes de edad avanzada, con limitaciones físicas o mentales, con aparatología protésica u ortodóncicas, los cuales pueden ver especialmente dificultada la tarea de remoción mecánica de su placa bacteriana.

En el área de la Periodoncia se han utilizado una gran cantidad de sustancias químicas con acción antiséptica o antimicrobiana, con éxito diverso, para inhibir el desarrollo de la placa supragingival y el desarrollo de las enfermedades periodontales (Lindhe, 2001).

La historia de éstas sustancias se remonta más allá de los 4000 años a.c., siendo una de las más detalladas la de Hipócrates, él cual se le atribuye varias recetas de polvos dentarios y colutorios bucales, que no carecían de lógica y que contenían con frecuencia partes de animales considerados como de buena dentadura o con dientes de erupción continua. Los colutorios contenían ingredientes que estimulaban el flujo salival, de enmascaramiento del mal olor bucal y de acción antimicrobiana, aún cuando no fuesen hechos con éstos propósitos. Entre los Romanos destacaba el vino blanco y en España; por ejemplo, se utilizaba orina vieja mientras que en Francia orina fresca (Lindhe, 2001).

Muchas fórmulas contenían ingredientes con propiedades antimicrobianas que incluían arsénico y sustancias herbáceas. Estos últimos están siendo cada vez más utilizados a pesar de sus escasos datos que apoyen su eficacia en la gingivitis y ninguno para las caries (Lindhe, 2001).

Diversos productos hasta fines del siglo XX, habitualmente como colutorios, podían causar daños locales en los tejidos, o incluso intoxicación sistémica, ya que incluían ácido sulfúrico aromático, percloruro de mercurio, ácido carbónico y formaldehído. Algunos intentos más específicos de usar antimicrobianos llegaron con el conocimiento de que las enfermedades periodontales están ligadas a microorganismos (Lindhe, 2001).

Los antibióticos influyen sobre la placa cuantitativa y cualitativamente por medio de diferentes vías. Estos mecanismos podrían ser los siguientes (Lindhe, 2001):

- 1.- Evitar la adherencia bacteriana con agentes anti-adhesivos y extraer la placa establecida
- 2.- Detener o retrasar la proliferación bacteriana
- 3.- Alterar la patogenicidad.

Es importante destacar que los antisépticos aportan una acción preventiva más allá de la terapéutica, los cuales han reportado un éxito diverso.

Estos se clasifican en (Lindhe, 2001):

Grupo	Ejemplos de sustancias	Acción	Uso actual/tipo de producto
Antibióticos	Penicilina Vancomicina Kanamicina Niddamicina Espiromicina	Antimicrobiana	*No
Enzimas	Proteasa Lipasa Nucleasa Destrababa Mutabasa Glucosa oxideas Amilaglicosidasa	Eliminación de placa Antimicrobiana	No Si Dentífrico
Antisépticos bisbiguanídicas	Clorhexidina Alexidina Octenidina	Antimicrobiana	Si Colutorio Spray Gel Dentífrico Goma de mascar Barniz
Compuestos cuaternarios de amotino	Cloruro de cetilpiridinio Cloruro de benzalconio	Antimicrobiana	Si Colutorio
Fenoles y aceites esenciales	Timo) Hexilresorcinol Eucalipto) Triclosan+	Antimicrobiana +Antiinflamatoria	Si Colutorio Dentífrico
Productos naturales	Sanguinarina	Antimicrobiana	Si Colutorio Dentífrico

Fluoruros	Fluoruro de sodio Monofluorfosfato sódico *Fluoruro estannoso *Fluoruro de amino+	Antimicrobiana	Si Dentífrico Colutorio Gel
Soles metálicos	Estaño Zinc Cobre	Antimicrobiana	Si Dentífrico Colutorio Gel
Agentes oxigenantes	Peróxido de hidrógeno Peroxiborato sódico Peroxicarbonato sódico	Antimicrobiana Eliminación de placa	Si Colutorio
Detergentes	Laurilsulfato sódico	Antimicrobiana Eliminación de placa	Si Dentífrico Colutorio
Alcoholes aminados	Octapinol Delmopinol	Matriz de la placa Inhibición	No

Tabla II. Grupos de sustancias usadas para el control de la placa dental y/o gingivitis.

Baker en 1993 estableció las propiedades ideales de los enjuagatorios bucales (Santos, 2003):

- Ser rápidos y efectivos
- Ser capaces de eliminar la placa bacteriana de zonas de difícil acceso
- Sabor agradable
- Tener bajo costo
- Fácil de usar y capaz de actuar en las zonas de inicio de las enfermedades (placa supragingival en la gingivitis, placa subgingival en periodontitis).

El vehículo por el cual se entrega el agente antimicrobiano tiene directa influencia en su efectividad, así como también en su mecanismo de acción.

Este debe cumplir con ciertos requisitos (Cummins, 1997):

- Brindar estabilidad química, física y microbiológica al agente antimicrobiano.
- Asegurar la liberación y biodisponibilidad óptima del agente en su sitio de acción.
- Deben ser tolerados por el paciente.
- No producir efectos secundarios o adversos, como tinciones, descamaciones o inducir cambios patogénicos en la flora microbiana.
- Cumplir con los requisitos legislativos y de las organizaciones profesionales de los distintos países (FDA, ADA).
- Costo beneficio favorable.

Según Fine, los objetivos de la terapia antimicrobiana son (Fine, 1995):

- 1.- Inhibir la colonización primaria en la superficie dentaria
- 2.- Inhibir el crecimiento y maduración de la flora microbiana
- 3.- Reducir o eliminar el potencial patogénico de la flora microbiana existente.

Para la correcta evaluación del agente antimicrobiano deben ser considerados los siguientes aspectos (Pallasch , 1996):

- 1.- Especificidad
- 2.- Eficacia
- 3.- Sustantividad
- 4.- Seguridad
- 5.- Estabilidad
- 6.- No producir cepas resistentes
- 7.- Idealmente debe alcanzar la flora subgingival

Evaluación de las sustancias y productos químicos

En la actualidad se busca la evidencia científica de las propiedades de las sustancias químicas. Éstas deben ser avaladas por diversos organismos de varios países, los cuales no aceptan un sólo protocolo para dar todas las respuestas, sino que es un proceso paso por paso que culmina en un cuerpo de evidencia que demuestra la eficacia final del producto. La evaluación utiliza métodos *in vitro* e *in vivo*.

La actividad antimicrobiana *in vitro* de los antisépticos no es en sí, un factor predictivo de la actividad inhibitoria de la placa bacteriana *in vivo* (Lindhe, 2001).

Pruebas In vitro

Ensayos bacterianos: Son pruebas antimicrobianas que determinan la concentración inhibitoria mínima (MIC), concentración bactericida mínima (MBC) y curvas de eliminación, que indican la actividad y el espectro antimicrobiano de los productos y fórmulas contra una gama de bacterias bucales. Éstas sólo indican primariamente la actividad o su falta y no predicen *per se* la acción antiplaca in vivo, ya que no dan información sobre la sustentividad del antimicrobiano. Pero, presenta ciertos puntos a favor, como son:

- Los agentes sin actividad *in vitro* no la tendrán *in vivo*
- Determinar los efectos aditivos o negativos de las mezclas de componentes
- Establecer la disponibilidad de los ingredientes activos incorporados a un producto
- Modelar la influencia adversa del medio bucal

Pruebas in vivo

Dentro de ellas podemos encontrar:

- *Test Antimicrobianos:*

El recuento bacteriano salival es mucho más indicativo de la sustentividad y predictivo de la acción antiplaca. Éste método consiste en hacer recuentos bacterianos salivales antes y, en distintos momentos, después de haber hecho un solo enjuague con el producto.

Las consideraciones sobre los diseños de las pruebas clínicas para la evaluación de sustancias tienen que ser a ciegas por lo menos para el examinador (ciego) y, si fuera posible, también para el sujeto (doble ciego). Por ello, los estudios no controlados pueden perder la ceguera e introducir un sesgo en las determinaciones. La elección de los patrones de controles pueden variar y entre ellos destacan (Lindhe, 2001):

- Control con placebo: En este caso actúa una sustancia sin ningún efecto farmacológico supuesto, por ejemplo agua destilada. Su importancia radica para evaluar a un agente nuevo.
- Control activo menos (control negativo): Comúnmente para determinar si en un producto tiene actividad su vehículo. Su importancia es útil en evaluar fórmulas iniciales.
- Control comercial: Son productos disponibles en el mercado y que son sensibles cuando se evalúan finalmente. Su importancia radica en determinar si la eficacia es superior. En nuestro estudio utilizaremos el Propóleo.

- Control positivo: Es un agente que se considera el más eficaz disponible. En este caso la CHX es el gold standard de los agentes antiplaca.

En la actualidad, la Clorhexidina (CHX) es el agente antimicrobiano más estudiado y eficaz en el control químico de la placa dental. Es considerado como control positivo con la cual, todos los otros agentes antiplaca son comparados (Jones, 1997 ; Herrera et al., 2003).

Clorhexidina

La CHX es un antiséptico bisguanídico de molécula simétrica compuesta de 4 anillos clorofenólicos y dos grupos de biguanida conectados por un puente central de hexametileno (Lindhe, 2002).

La CHX posee pH fisiológico (7.4) con amplia actividad antibacteriana, baja toxicidad en células de mamíferos y una alta afinidad para unirse a la piel y a las membranas mucosas (Herrera et al., 2003).

Por su naturaleza dicatiónica es extremadamente interactiva con los aniones, lo cual es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios locales y dificultades para formularla en los productos (Lindhe, 2002).

Dentro de los mecanismos de acción de la CHX podemos destacar (Perez et al., 2000):

- Disminución de la película adquirida
- Alteración la adherencia entre bacterias y de éstas a la superficie dental
- Alteración de la pared celular de las bacterias (lisis celular)
- Sustantividad: absorbida en superficie de tejidos y en superficies dentales que es liberada posteriormente en forma lenta y activa

La carga negativa que presenta la célula bacteriana permite que la molécula de CHX sea atraída sobre su superficie con una adsorción fuerte y específica a los componentes fosfatados. Esto permite que se afecte su equilibrio osmótico, lo que altera la integridad de la membrana celular de la bacteria siendo la CHX atraída hacia los fosfolípidos de la membrana interna, aumentando la permeabilidad y filtrándose componentes de bajo peso molecular tales como iones de potasio (Jones, 1997).

La CHX posee mecanismos que actúan inhibiendo la placa bacteriana:

- Boqueando los grupos ácidos libres de las glucoproteínas salivales, evitando la formación de la película adquirida (Greenstein et al., 1986; Lang et al., 1986; Pader, 1988; Rolla et al., 1975).
- Impidiendo la adhesión de las bacterias a la superficie dentaria (Greenstein et al., 1986; Pader, 1988; Rolla et al., 1975).
- Desorganizando las masas bacterianas previamente formadas. (Pader, 1988; Rolla et al., 1975).

La CHX es activa frente a microorganismos Gram (+) y Gram (-), hongos, facultativos anaerobios y aerobios, por tanto posee un amplio efecto antimicrobiano. Se ha probado que reduce los microorganismos aerobios y anaerobios en un 54% a 97% en un período de seis meses

y se ha probado que los organismos Gram positivos son más sensible que los Gram negativos y que los estreptococos más que los Estafilococos (Bascones y Manson, 1994).

Debido a la demostrada eficacia de la CHX, ésta ha sido incluida en diferentes vehículos para uso intraoral, tales como enjuagatorios, geles, dentrífugos, sprays, gomas de mascar, etc; a diferentes concentraciones y a diferentes formulaciones, incluso asociada con otros productos activos, o con la meta de obtener una formulación más estable, o reducción de los efectos secundarios (Santos, 2003).

De las diferentes CHX presentes en el mercado, la más utilizada es el colutorio, cuya formulación varía entre las diferentes marcas comerciales. Los componentes básicos de todo colutorio son el alcohol, la glicerina, agentes saborizantes más el principio activo (Genco et al., 1993). La función del alcohol es aumentar el impacto del sabor para solubilizar el saborizante y algunos ingredientes activos, además de promover algunos poderes preservantes, y de cumplir una función antiséptica (Foward et al., 1997).

Usada como colutorio, la CHX tiene varios efectos colaterales locales, de los cuales el más común y problemático es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas, sobretodo el dorso de la lengua (Lindhe, 2001). Sin embargo, éstas tinciones tienen carácter reversible y parecen ser originadas por la interacción de las sales de CHX y los taninos presentes en algunos alimentos (té, vino) (Addy et al., 1995).

La CHX tiene un gusto amargo que es difícil de enmascarar y en muchas personas causa alteraciones del gusto, sobretodo del gusto salado (Lindhe, 2001).

Propóleo

El Propóleo es una mezcla compleja de cera de abeja, pequeñas cantidades de azúcar y exudados de plantas, colectados por las abejas desde varios árboles, hierbas y arbustos (Marcucci, 1995; Greenaway et al., 1990).

Ésta sustancia es conocida por el hombre desde tiempos remotos. Los sacerdotes del antiguo Egipto la utilizaban como sustancia medicinal y como parte integrante de los ungüentos y cremas de embalsamar. Más tarde lo utilizaron los Griegos, a quienes debemos su nombre, ya que la palabra deriva de *pro* que significa “defensa de” y *polis* que quiere decir “ciudad”, entonces corresponde a la defensa de la colmena.

Aristóteles considera los propóleos como remedios para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones. Galeno en el siglo II menciona el Propóleo en sus trabajos y el famoso médico y filósofo Persa Avicena, en el siglo VI dice que tiene la cualidad de eliminar las puntas de flechas y las espinas. Los Incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infección febril (Hegazi, 1997).

Su máximo empleo en la era moderna se produjo durante la guerra de los Boers, en África del sur alrededor del 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante. Más cercano a nuestros días, su uso se intensificó durante la Segunda Guerra Mundial para el tratamiento de heridas. Con el descubrimiento de la penicilina y el advenimiento de los modernos antibióticos, se comenzó a dejar de lado pero, paradójicamente, esa tendencia ha comenzado a revertirse, ya que se están realizando investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de Propóleo en los campos de la biología, la medicina humana y la odontología (Hegazi, 1997).

Marcucci en 1995 encontró que los compuestos de la resina del Propóleo se originaban de tres fuentes: de los exudados de plantas recolectadas por las abejas, sustancias secretadas de su propio metabolismo y otros materiales, los cuales son introducidos durante su preparación (Marcucci, 1995).

El estándar de calidad vigente para el Propóleo es la identificación botánica y las pruebas cromatográficas que corroboran la procedencia de Propóleo (Burdock, 1998). Una técnica muy útil e informativa para determinar el origen botánico de Propóleo, consiste en el análisis microscópico de los granos de polen y de fragmentos de hojas u otros restos dejados por las abejas durante la recolección del exudado de planta, los cuales son frecuentes contaminantes (Montenegro et al., 2000). La estructura de la exina, cubierta externa del polen, es característica de la especie de planta que le da origen y sirve para realizar un análisis taxonómico (Ricciardelli, 1973).

Su color es variable y puede ir desde el verde pardo al castaño o al negro, dependiendo de su origen botánico. Posee sabor fuertemente amargo y olor agradable y dulce de forma que

cuando se quema, exhala una fragancia de resina aromática. A temperatura ambiente presenta una consistencia dura y frágil, pero cuando es calentado, se convierte en blando y muy pegajoso.

El porcentaje de abejas que produce Propóleo es menor en comparación a las encargadas de recolectar néctar o polen y la cantidad de Propóleo en la colmena difieren entre las colonias. Cerca de un 3% de las abejas de la colmena producen Propóleo, debido a que es un trabajo muy desgastador que reduce la vida de la obrera en un 20% aproximadamente (Valcic et al., 1999).

Las propias abejas determinan las funciones del Propóleo en la colmena de acuerdo a sus necesidades. Lo utilizan por sus cualidades antisépticas y desinfectantes para el tapizado interior de las celdillas que albergan los huevos y las larvas; por su consistencia y propiedades aislantes, para rellenar grietas y agujeros, así como también para revestir el interior de la colmena a fin de disminuir las corrientes de aire, la temperatura y las vibraciones. También lo utilizan para embalsamar a los intrusos que ingresan a la colmena y evitar así su putrefacción. Mezclado con tierra, cera, arena y restos vegetales, lo emplean para achicar el tamaño de la entrada de la colmena y así bloquear el ingreso de indeseables o protegiendo la colmena en caso de clima frío o de mucho viento (Muñoz et al., 2000).

La composición precisa del Propóleo en bruto varía de acuerdo al tipo de fuente. En general, está compuesto de (Monti et al., 1983; Cirasino et al., 1987; Uzel et al., 2005):

Componentes	Porcentaje
Resina y Bálsamo Vegetal	50%
Cera	30%
Esencias y aceites aromáticos	10%
Polen	5%
Otras sustancias	5%

Tabla III. Componentes del Propóleo y sus porcentajes.

Según Greenaway la composición cualitativa principal del Propóleo puede resumirse en (Greenaway et al., 1990):

- Aminoácidos, aunque los niveles son bajos en torno al 0,40%, considerando que éstos son aportados por las abejas a través del polen
- Ácidos aromáticos y ésteres, principalmente ácido benzoico, ácido caféico, ácido ferúlico, provenientes de los exudados de las yemas vegetales
- Flavonas y flavononas, originarias de los exudados vegetales y que tienen elevada actividad biológica, entre las cuales resaltan: pinocembrina, quercitina, galangina, pinostrobin, sakuranetina y crisina.
- Terpenoides, que provienen de exudados vegetales y los aromáticos, son los responsables del aroma del propóleo, destacan limoneno, cimen y estireno.

En general, revisiones sobre la composición química del Propóleo dan cuenta de los siguientes grupos químicos: aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos y ésteres aromáticos, chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares (Marcucci, 1995).

Los constituyentes del Propóleo varían extensamente de acuerdo al clima, estación, localización y año, y su fórmula química no es estable (Ghisalberti, 1979; Cheng y Wong, 1996; Uzel et al., 2005).

Los exudados de brotes de álamo (*Populus* spp., Salicaceae) y castaño (*Aesculus hippocastanum* L., Hippocastanaceae) corresponde a las mayores fuentes del Propóleo Europeo y Norteamericano, el cual presenta en su composición aceites volátiles y fenólicos principalmente flavonoides y flavanonas. En contraste al Propóleo del hemisferio norte, el propóleo chileno tendría un origen botánico diferente, puesto que Chile presenta una flora única desarrollada como resultado de su aislamiento geográfico entre el Océano Pacífico por el este y la Cordillera de los Andes por el oeste. La flora chilena está compuesta por muchas especies de plantas endémicas, sin embargo el álamo y el castaño no son nativos de Chile y fueron introducidos en ciertas zonas del país en las cuales no se localizan colmenas (Valcic et al., 1999).

En Chile un estudio de Muñoz et al. sobre colmenas de matorrales de la zona central, determinó que el propóleo chileno se elaboraba principalmente de resinas *Baccharis* (a éste género corresponden especies como el romero y la chilca), *eucalyptus*, álamo blanco (*Populus alba* o *poplars*) y *sauce criollo* (*Salix humboldtiana*) y lograron aislar y caracterizar seis componentes: viscidone, vanillina, 3',4'-(metilendioxy) acetofenona, 3-etoxy-4-metoxibenzaldehído, ácido cinámico y 3-metoxi-4-hidroximetil éster (Muñoz et al., 2000).

Chaillou al analizar las propiedades físicas de una muestra de Propóleo de Argentina, determinaron lo siguiente (Chaillou, 2004):

1.- Características organolépticas: 100% presentó estructura homogénea, el 45% presentó un aspecto de trozos irregulares con brillo, el 30% con poco brillo, y el resto trozos irregulares opacos. Los ensayos de consistencia mostraron que el 45% de las muestras eran poco blandas, el 40% duras y solamente un 15% blandas. Con respecto al color, el 65% de las muestras presentaron color marrón oscuro, un 20% marrón claro con tintes amarillos, un 10% con tintes castaños. El olor del 75% de las mismas fue resinoso, y el sabor de la totalidad de los Propóleos fue picante.

2.- Punto de fusión: los valores encontrados para las diferentes regiones en estudio fluctuaron entre los 64 °C y 89.5 °C, con un promedio de 70 °C.

3.- Impurezas mecánicas, ceras y resinas: el valor medio de impurezas mecánicas analizadas fue de 24,063%, contenido de cera promedio, de 30,048% y el porcentaje de resinas 44,770%.

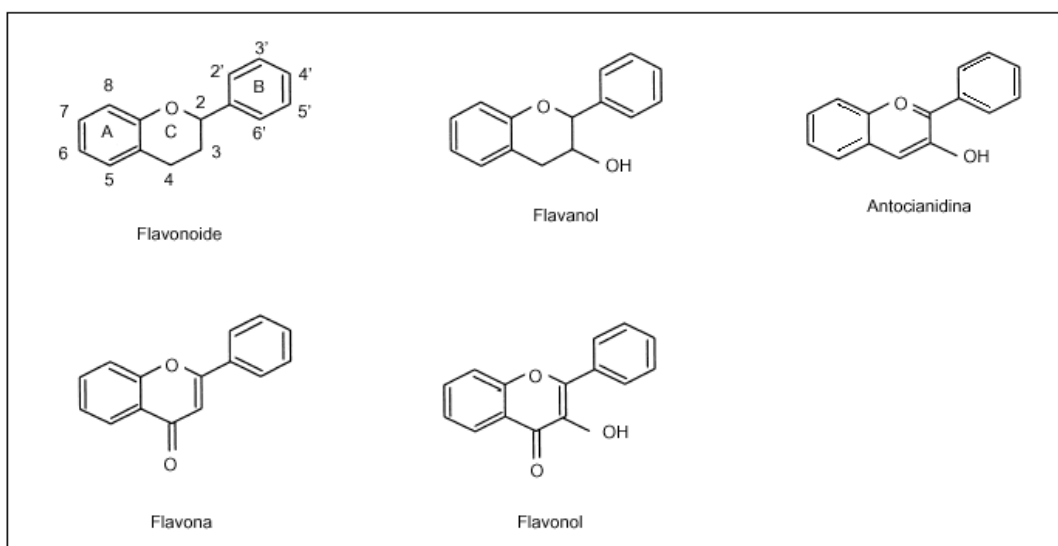
4.- Índices de oxidación, compuestos fenólicos y flavonoides: el rango de valores del índice de oxidación osciló entre los 4 y 18 segundos, el promedio fue de 9,8 segundos.

Se han descrito muchas actividades biológicas para el Propóleo, incluyendo capacidad antibacteriana (Grange y Darvey, 1990; Ikeno et al., 1991; Kujumgiev et al., 1993; Menezes et al., 1997; Santos, 2002), antifúngica (Valdés et al., 1987; Santos, 2002), antiprotozoos (Séller et al., 1977; Santos, 2002), antiviral (Amoros et al., 1992; Santos, 2001), antitumoral (Grunberger et al., 1988; Santos, 2002), inmunomoduladora (Dimov et al., 1992; Santos, 2002), antiinflamatoria (Dobrowolski et al., 1991; Santos, 2002), antioxidante (Sun et al., 2000; Isla et al., 2001; Uzel et al., 2005) y actividad antihepatotóxica (Banskota et al., 2001; Uzel et al., 2005), entre otras.

Los constituyentes más importantes farmacológicamente activos en el Propóleo son los flavonoides, fenólicos y aromáticos. Los Flavonoides son considerados por muchos como los responsables de la actividad biológica del Propóleo. Éstos corresponden a pigmentos naturales ampliamente distribuidos en plantas, verduras, frutas y en bebidas como vino y cerveza, los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo sino incorporarse a través de los alimentos o en forma de suplementos. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, que generalmente exhiben brillantes colores como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz UV, y se localizan en las células de las plantas verdes. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Ellos regulan el crecimiento de las plantas e influyen en otras células biológicas de diversas maneras. Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas, y además, destruyen algunos importantes protozoos (Havsteen, 2002). Poseen actividad antialérgica, anti-inflamatoria, antioxidante, atrapadora de radicales libres, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. Además, se puede decir que aportarían grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos en cáncer y prevención de ataques al corazón. Su toxicidad a células animales es baja. Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar muchas importantes enfermedades, debido a su habilidad de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas y neurotransmisores, y eliminar radicales libres (Havsteen, 2002).

Se ha determinado que Propóleos cuyo origen botánico es género *Populus*, y que contienen principalmente fenoles, flavonas y flavonoides en importante proporción (mayoritariamente pinocembrina y galangina), poseen una mayor actividad antimicrobiana que aquellos de origen botánico mixto que contienen derivados de ácidos diperténicos, ácidos grasos hidroxilados o cinamil cinamato (Popova et al., 2005).



Dibujo 1. Flavonoides, estructura básica y tipos.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero, además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Las características antimicrobianas de esta mezcla natural de sustancias son atribuidas principalmente al flavonoide pinocembrina, al flavonoide galangina y ácido caféico fenetil éster. Según el estudio realizado por Duarte et al. sobre la composición y actividad biológica de un nuevo tipo de Propóleo libre de flavonoides, concluyó que la eficacia de ésta sustancia está más relacionada con el sinergismo de sus componentes, que con la acción aislada de alguno de ellos (Duarte et al., 2003; Feres et al., 2005).

Las actividades biológicas de algunos de los componentes más importantes del Propóleo son:

-Pinocembrina: actividad antibacteriana, fungicida, y utilidad como anestésico local (Muñoz et al., 2001).

-Acacetina: propiedades antiinflamatorias (Bankova et al., 1983). Además, recientemente se ha visto que es un poderoso inhibidor de enzimas presentes en el Citocromo P450 (pertenecientes a la familia de las enzimas denominadas CYP1), que estarían involucradas en el metabolismo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos y hormonas. Por ello se especula que estas enzimas tendrían un rol importante en la aparición de algunos tipos de cáncer, más aún, que han sido detectadas en algunas muestras de tejidos cancerígenos (Doodstar et al., 2000).

-Conferido: promisorio agente anticarcinogénico al inducir directamente quinona reductasa y otras enzimas protectoras, sin promover la activación de otros carcinógenos (Yannai et al., 1998).

-Galangina: es uno de los flavonoides que con mayor frecuencia se han encontrado en propóleos, presenta actividad antimutagénica, antioxidante, secuestrador de radicales libres y modulador de actividad de enzimas metabólicas pero, se destaca principalmente por su capacidad antigenotóxica como un potente agente quimioprotector frente al cáncer (Heo et al., 2001). Además posee actividad antibacteriana (Montenegro et al., 2001).

-Ácido caféico fenetil éster: posee un mecanismo de acción probablemente basado en la inhibición de la RNA polimerasa bacteriana (Takaisi-Kikuni y Schilcher, 1994; Muñoz et al., 2000; Uzel et al., 2005).

La distinta composición química del Propóleo de diversos orígenes, conduce a pensar que las propiedades biológicas sean disímiles entre ellos, sin embargo, en la mayoría de los casos ésta afirmación es errada. Por supuesto, los compuestos responsables son diferentes pero, las funciones que el Propóleo desarrolla en la colmena son siempre las mismas. Lo anterior, quedó demostrado en un estudio realizado por Bankova donde comparó propóleos de 4 distintos orígenes (Europa, Brazil, Cuba, Taiwan) y determinó cuales eran los compuestos químicos responsables de ciertas propiedades biológicas (Bankova et al., 2005).

Tipo de Propóleo	Actividad Antibacterial	Actividad Antiinflamatoria	Actividad Antitumoral	Actividad Antihepatotóxica	Actividad Antioxidante	Acción Alergénica
Europeo (tipo álamo)	Flacondes, flavononas, ácidos fenólicos y sus ésteres (14)	Flacondes, flavononas, ácidos fenólicos y sus ésteres (15)	Ácido caféico, ester phenetyl (16)	Ácido caféico, ácido ferúlico, y sus ésteres (15)	Flavonoides, fenólicos y sus ésteres (15)	3,3- <i>dimethylallyl caffate</i> (14)
Brasileño tipo <i>Baccharis</i>	Ácido p-cumarínico, <i>labdane</i>	No identificados (15)	Ácido p-cumarínico, <i>clerodane</i>	Ácido p-cumarínico, flavonoides,	Ácido p-cumarínico, flavonoides	No probados

	<i>pterpenes</i> (15)		<i>diterpenes, Benzofuranos</i> (15)	<i>lignas, caffeoyl quinic acid</i> (15)	(15)	
Cubano	<i>Prenylated benzofenonas</i>	No probados	<i>Benzofenonas Prenylated</i> (13)	No identificados	<i>Prenylated benzofenonas</i> (13)	No probados
Taiwanes	No probados	No probados	<i>Prenylated Flavononas</i> (42)	No probados	No probados	No probados

Tabla IV. Componentes responsables de la actividad biológica de diversos tipos de Propóleos.

En general, las propiedades antimicrobianas del Propóleo han sido investigadas en los últimos años, sin embargo, es difícil comparar los resultados de diferentes estudios, debido tanto a las diferentes composiciones como a los diferentes métodos utilizados para su estudio.

En particular, la actividad biocida del Propóleo estudiada frente a bacterias de interés en medicina, ha mostrado resultados alentadores *in vitro* e *in vivo*, ya que inhibió el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, tanto Gram positivo como Gram negativo. Sin embargo, se ha señalado que el efecto del propolis en contra de bacterias Gram positivo y levaduras, es mayor que sobre bacterias Gram negativo (Quintana et al., 1997; Drago et al., 2000; Stepanovic et al., 2003). Stepanovic et al. utilizaron 13 tipos de propóleos de Serbia frente a 39 tipos de microorganismos, bacterias (Gram positivo y Gram negativo) y levaduras. Además, evaluaron sinergismo entre antibióticos y Propóleo. En ambos estudios, obtuvieron inhibición de crecimiento de bacterias y levaduras, y observaron sinergismo entre antibióticos y Propóleos, y entre antifúngicos y Propóleos (Stepanovic et al., 2003).

El mecanismo de acción antimicrobiano del Propóleo es complejo y no está completamente entendido. La actividad en contra de los microorganismos está más relacionada al efecto sinérgico de los flavonoides (y otros fenoles), que a la acción de cada uno de ellos por separado (Amoros et al., 1994; Bonhevi et al., 1994). Estos descubrimientos están de acuerdo con lo que estudió Takaisikikuni y Schilcher, quienes observaron que la acción antibacteriana utilizaba varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriolisis parcial, e inhibición de la síntesis de proteínas. (Takaisikikuni y Schilcher, 1994).

Además se observó una inhibición de la división celular en presencia de Propóleo y este hecho sugirió que el propóleos podría actuar inhibiendo la replicación del DNA a través de la RNA polimerasa e, indirectamente, afectando la división celular (Takaisikikuni y Schilcher, 1994).

El uso clínico de antibióticos y otros agentes antimicrobianos, como coadyuvantes en el tratamiento periodontal, ha sido extensamente investigado en la década pasada. A pesar de que

gran cantidad de estudios han demostrado la actividad antimicrobiana del Propóleo, especialmente contra bacterias Gram positivas (Focht et al., 1993; Steinberg et al, 1996; Bretz et al., 1998; Montenegro et al., 2000; Muñoz et al., 2000), sólo pocos han determinado el efecto inhibitorio contra bacterias anaerobias de relevancia odontológica (Santos et al., 1999; Uzel et al., 2005).

De acuerdo al estudio realizado por Gebara et al. se comprobó la eficacia in vitro del Propóleo contra los siguientes patógenos periodontales: *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *C. gingivalis* y *F. nucleatum*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Gebara et al., 2002). Escobar et al. en el 2003 evaluó el efecto de la irrigación subgingival con extracto de Propóleo de acuerdo a parámetros clínicos y microbiológicos, observando una disminución en el recuento total de bacterias anaeróbicas, concluyendo que el Propóleo como coadyuvante del tratamiento periodontal es más efectivo que el tratamiento convencional sólo (Escobar et al., 2003). Un estudio más específico realizado por Gajardo et al., sobre la actividad biocida in vitro de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis* concluyó que éste tiene la propiedad de inhibir el crecimiento de la bacteria periodontopatógena (Gajardo M. et al., 2006).

En Europa el Propóleo es muy utilizado como un componente farmacéutico y en productos cosméticos, tales como preparaciones anti-acné, cremas faciales, ungüentos y lociones. El Propóleo en nuestro país es procesado por diversos laboratorios que comercializan este producto natural, por ello existen varias presentaciones comerciales tales como comprimidos (120 mg), jarabes (al 10%), gotas (al 10%) y spray. De acuerdo a estas presentaciones es el uso para el cual fue fabricado, los comprimidos y jarabes se indican principalmente para fortalecer las defensas del organismo a nivel sistémico, en gotas para aplicación directa sobre las zonas afectadas y la formulación en spray está especialmente indicada para afecciones de la garganta. Además, muchas veces son incluidos otros productos de origen natural como miel y mentol para potenciar sus efectos y aumentar los beneficios.

Las reacciones adversas a la aplicación local de Propóleo son escasas y se refieren generalmente a reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo dermatitis de contacto (Fernandez et al., 2004). Se han descrito hasta la fecha un total de 250 casos de alergias por dermatitis de contacto al Propóleo. Los reportes generalmente se describen con dermatitis en las zonas palmares y dedos, correspondiente a la manipulación de partes de la colmena que contienen Propóleo, o bien, se han visto reacciones alérgicas en la mucosa oral, mucositis orales agudas con ulceraciones, debido a la ingesta de grageas o gotas de Propóleo (Hay y Greig , 1990). El principal agente sensibilizante descubierto en la composición del Propóleo corresponde a 3-metil-2-butenil cafeato y feniletíl cafeato. Posiblemente existan otros alérgenos no descubierto a la fecha (Gulbahar et al., 2005).

HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico del Propóleo al 0.2% utilizado como colutorio presenta actividad antimicrobiana contra bacterias anaerobias presentes en la saliva de pacientes con Periodontitis Crónica.

OBJETIVOS

1.- Objetivo General

- Evaluar la actividad antimicrobiana in vivo de un extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% contra bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica.

2.- Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% en comparación a la CHX al 0.12% sobre bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% en comparación al etanol al 0.2% sobre bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica.
- Establecer si existe influencia del etanol en la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2%.
- Determinar variaciones en la actividad antimicrobiana en el tiempo, de cada colutorio y entre los diferentes colutorios entre sí.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizará un estudio de diseño aleatorio, paralelo, a triple ciego, y con tres variables. A partir de los pacientes ingresados en el año 2006 en las clínicas de Pre-grado de Cátedra de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, se seleccionaron 21 de ellos con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de Inclusión

- 1.- Voluntarios dispuestos a cumplir las condiciones del estudio y a firmar un consentimiento informado.
- 2.- Pacientes diagnosticados con Periodontitis Crónica Moderada o Avanzada Generalizada
- 3.- Pérdida de inserción clínica de 3 mm o más
- 4.- Más del 30% de los sitios afectados
- 5.- Mínimo de dieciséis dientes presentes en boca
- 6.- Mayores de 30 años

Criterios de exclusión

- 1.- Ausencia de enfermedades sistémicas como diabetes o algún tipo de inmunodepresión y en el caso de mujeres, no estar embarazada.
- 2.- No usar ningún otro colutorio por lo menos una semana antes.
- 3.- No haber recibido antibióticos, inmunosupresores u otros medicamentos durante los últimos tres meses.
- 4.- No consumir ningún tipo de comida ni ingerir líquidos en los tiempos de prueba.

Colutorios a comparar:

- 1.- Clorhexidina al 0.12% sin alcohol (Oralgene ®, Laboratorio Maver).
- 2.- Extracto hidroalcohólico de Propóleo diluido en agua destilada al 0.2%.
- 3.- Vehículo (etanol al 0.2%).

Materiales Etapa Clínica

- 10 ml por paciente de un preparado comercial de solución madre hidroalcohólica de Propóleo al 40% diluido en agua destilada hasta alcanzar una concentración al 0.2%.
- 10 ml por paciente de CHX al 0.12% (Oralgene ®, Lab. Maver)

- 10 ml por paciente de vehículo etanol al 60% diluido en agua destilada hasta alcanzar una concentración al 0.2%.
- 3 botellas opacas de 250 cc.
- 63 vasos plásticos desechables.
- 63 dosificadores de 10 ml.
- Cronómetro.
- Medio liofilizado Tioglicolato para anaerobios Thioglycollate Medium U.S.P. Oxoid ® 500 gramos (ver anexo 2).
- Pipetas de vidrio de 10 ml.
- Caja de transporte con congelante.
- Toalla de papel desechable.
- Mechero.

Materiales Etapa de Laboratorio

- Mechero.
- Suero fisiológico.
- 300 Asas de Drigalsky.
- 504 Placas de agar + cerebro corazón de 10 cm Biomerieux ® (ver anexo 2).
- Jarras para cultivo de bacterias anaerobias.
- Sobres generadores de anaerobiosis.
- Indicadores de anaerobiosis.
- Estufa de cultivo.
- Medio liofilizado Tioglicolato para anaerobios Thioglycollate Medium U.S.P. Oxoid ® 500 gramos.
- Tubos de ensayo graduados.
- Pipetas de vidrio (1, 2, 5 y 10 ml.).
- Papel.
- Toalla desechable.
- Guantes y mascarillas.
- Contador de colonias.

Procedimientos

Participaron cuatro operadores (O) con las siguientes funciones:

O1: Encargado de embotellar cada colutorio y rotularlos con las letras A, B y C. Las tres soluciones se envasaron en botellas opacas e iguales. Este operador guardó la información sobre la identificación de los productos hasta el fin de la etapa experimental.

O2: Dosificación del colutorio, toma de muestras de saliva, cultivo bacteriológico y recuento de Unidades Formadoras de Colonias. Además de la determinación aleatoria del orden de prueba de los colutorios con los respectivos códigos.

O3: Dosificación del colutorio, toma de muestras de saliva, cultivo bacteriológico y recuento de Unidades Formadoras de Colonias. Además de la determinación aleatoria del orden de prueba de los colutorios con los respectivos códigos.

O4: Dosificación del colutorio, toma de muestras de saliva, cultivo bacteriológico y recuento de Unidades Formadoras de Colonias. Además de la determinación aleatoria del orden de prueba de los colutorios con los respectivos códigos.

Período experimental

Esta etapa se llevó a cabo entre el 30 de mayo y el 4 de Julio del 2006. Durante el día experimental se suspendió la higiene oral.

Se recolectó de cada paciente una muestra basal de 1 ml de saliva no estimulada en ayunas, la cual se depositó en un tubo de ensayo con el medio de transporte para anaerobios (tioglicolato), y se mantuvieron en un medio refrigerado (por un máximo de 120 minutos), al igual que las muestras posteriores. Inmediatamente después los pacientes recibieron 10 ml de la solución del colutorio a comparar para realizar con ellos enjuagatorios por 30 segundos que luego escupieron. Después de ello, la saliva fue recolectada a los 10 y 60 minutos, considerando que en ese intervalo de tiempo el paciente no podía enjuagarse, cepillarse los dientes ni ingerir ningún tipo de comida.

La secuencia realizada en cada período experimental es la siguiente:

1.- Primera muestra de saliva: a cada paciente se le recolectó 1 ml. de saliva no estimulada, la cual fue recogida en un tubo de ensayo estéril que contenía 1 ml. de medio liofilizado Tioglicolato para anaerobios. Se rotularon los tubos de la siguiente manera:

- Identificación del individuo con letras minúsculas
- Muestra basal

2.- Posteriormente, los pacientes recibieron un vaso plástico desechable con 10 ml de uno de los colutorios, luego de 30 segundos de enjuague debieron escupir y no ingerir ningún tipo de comida y/o agua, ni realizarse higiene durante los siguientes 60 minutos.

3.- A los 10 y 60 minutos se recolectaron nuevas muestras de salivas de 1 ml, en tubos de ensayo estériles que contenían 1 ml de medio liofilizado Tioglicolato para anaerobios, procediendo a rotular el tubo con:

- Identificación del paciente con letras minúsculas y el colutorio usado.
- Muestra a los 10 ó 60 minutos.

Procedimiento de laboratorio (Procedimiento bacteriológico)

1. La primera dilución fue realizada agregando con una pipeta 1 ml. de la muestra a un tubo con 9 ml de suero fisiológico, secuencialmente se realizaron las diluciones de dicho contenido obteniendo diluciones al 100, 1000 y 10000 para facilitar el recuento bacteriano.
2. La siembra se hizo con 0.1 ml de las diluciones 100 y 1000 en Agar Schaedler + 5% de sangre de cordero Biomerieux ® en forma duplicada.
3. Una vez sembrada la totalidad de las placas, se introdujeron en jarras de anaerobiosis.
4. Se colocó el indicador de anaerobiosis Biomerieux ® humedecido en agua destilada.
5. Se abrió en forma manual el sobre de aluminio que contenía el generador de anaerobiosis Biomerieux ®. Se colocó rápidamente el generador en la jarra, ya que la reacción comienza apenas el generador entra en contacto con el aire, debido a esto, la jarra debe ser cerrada antes de un minuto después de haber colocado el generador. Como máximo se utilizó un generador cada doce placas y dos generadores por cada 40 placas.
6. Se cerró herméticamente la jarra.
7. Se llevaron las placas a la estufa de cultivo a 37° C por 48 horas.
8. Luego del tiempo de incubación se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Análisis estadístico de los datos

Los resultados fueron tabulados en una planilla Excell. Posteriormente los recuentos basales fueron sometidos a un análisis descriptivo. Los recuentos de los 10 y 60 minutos fueron sometidos a Análisis Anova y de acuerdo a la significancia se aplicó el t- student. Se utilizó un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

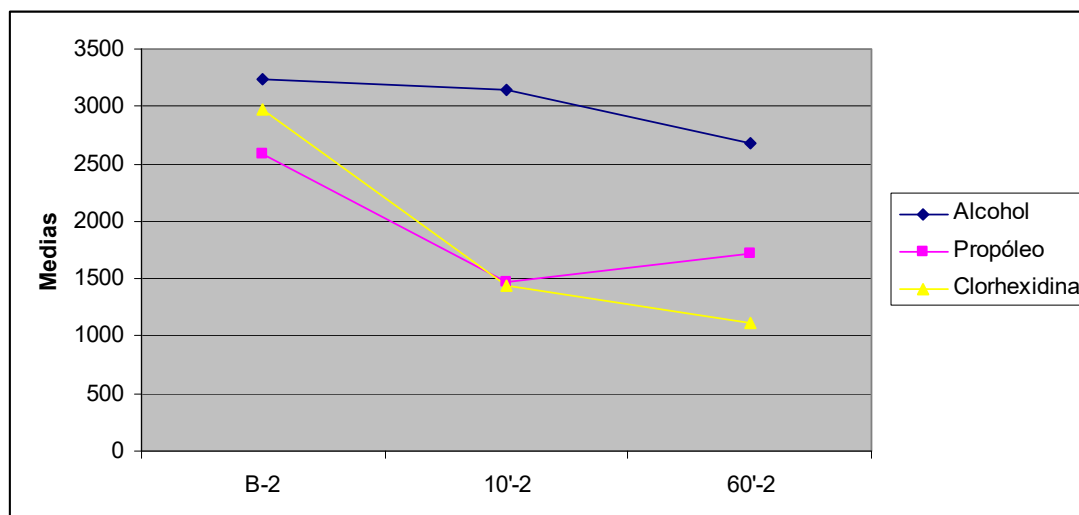
En este estudio se midieron los recuentos de UFC basales (t0), a los 10 (t1) y 60 minutos (t2) posteriores al enjuague. Luego los datos basales fueron registrados y analizados descriptivamente verificando que los participantes pertenecían al mismo Universo. Los datos obtenidos en t1 y t2 fueron sometidos al análisis Anova. Como los resultados obtenidos de este análisis fueron significativos, es decir, existió diferencias entre los colutorios pero no se podía especificar cual era el distinto, se sometieron los datos a un t-student para muestras independientes, debido a que éstas fueron tomadas a diferentes pacientes, considerando como variables los colutorios en las distintas tomas de muestras.

Análisis de medias de recuento bacteriano a dilución 100

Tabla V: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas en distintos tiempos para cada uno de los colutorios a dilución 100.

Tiempo	Colutorio		
	Alcohol	Propóleo	Clorhexidina
B-2	3229	2591	2976
10'-2	3143	1475	1445
60'-2	2681	1718	1108

Gráfico 1: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas en distintos tiempos para cada uno de los colutorios a dilución 100.



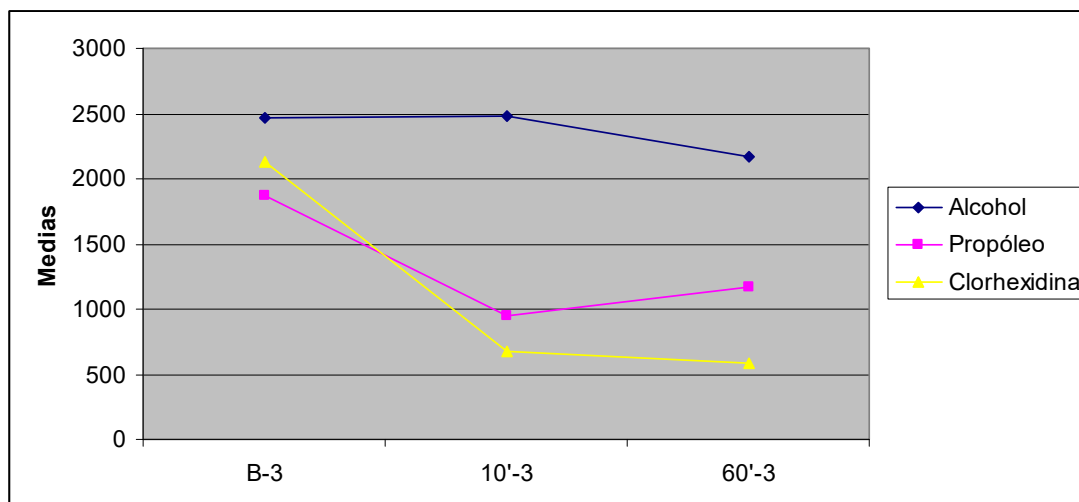
Se observa que la mayor baja en el valor medio del recuento bacteriano se produce con Clorhexidina, ésta se mantiene hasta los sesenta minutos donde es la última medición, mientras que con Propóleo si bien se produce una baja significativa en el primer intervalo, en el segundo aumenta. El comportamiento en el caso del alcohol es bastante discreto ya que no presenta grandes variaciones.

Análisis de medias de recuento bacteriano a dilución 1000

Tabla VI: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas en distintos tiempos para cada uno de los colutorios a dilución 1000.

Tiempo	Colutorio		
	Alcohol	Propóleo	Clorhexidina
B-3	2465	1874	2135
10'-3	2484	942	677
60'-3	2169	1167	591

Gráfico 2: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas en distintos tiempos para cada uno de los colutorios a dilución 1000.



El comportamiento de las mediciones de recuento bacteriano para los tres colutorios analizados es muy similar al obtenido en el gráfico donde la dilución es 100, mientras que en este caso es 1000, cabe destacar que si bien el comportamiento es prácticamente igual la escala de los valores medios disminuye ya que el mayor valor bordea los 2500 mientras que en el caso anterior era 3200.

Análisis de Recuentos Bacterianos Basal

Dilución 100

Tabla VII: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas basal para cada uno de los colutorios a dilución 100.

Muestra	Colutorio		
	Alcohol	Propóleo	Clorhexidina
1	2910	1694	2451
2	3830	3174	3487
3	2924	2324	2468
4	2470	2342	2533
5	3190	768	2767
6	3702	3587	3895
7	3580	4251	3234

Tabla VIII: Estadísticas Descriptivas de las muestras Basal a dilución 100.

Colutorio	N	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Estd
Alcohol	7	3229,285	2470	3830	496,648
Propóleo	7	2591,357	768	4251	1179,663
Clorhexidina	7	2976,142	2450	3895	569,627

Se observa de la tabla que la mayor desviación estándar la presenta el colutorio Propóleo. A continuación se presentan los gráficos para cada uno de los colutorios, los tres fueron graficados en una misma escala de 0 a 5500 con la intención de compararlos, de aquí se puede observar tanto en las gráficas como en la tabla 8 que las distribuciones de las muestras correspondientes a los colutorios alcohol y clorhexidina están contenidas en la distribución del Propóleo, la cual como se mencionó anteriormente presenta una mayor desviación estándar.

Gráfico 3: Histograma Recuento Bacteriano Alcohol a dilución 100.

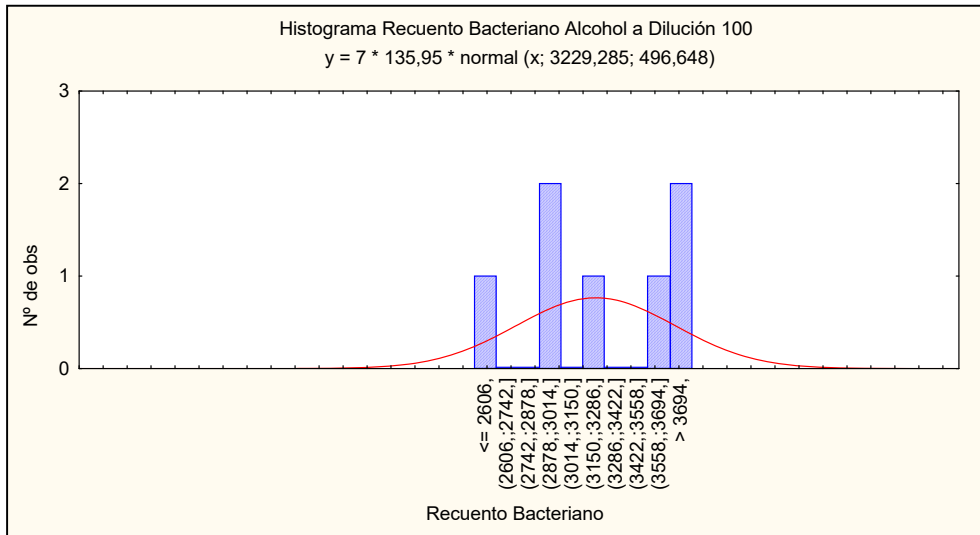


Gráfico 4: Histograma Recuento Bacteriano Propóleo a dilución 100.

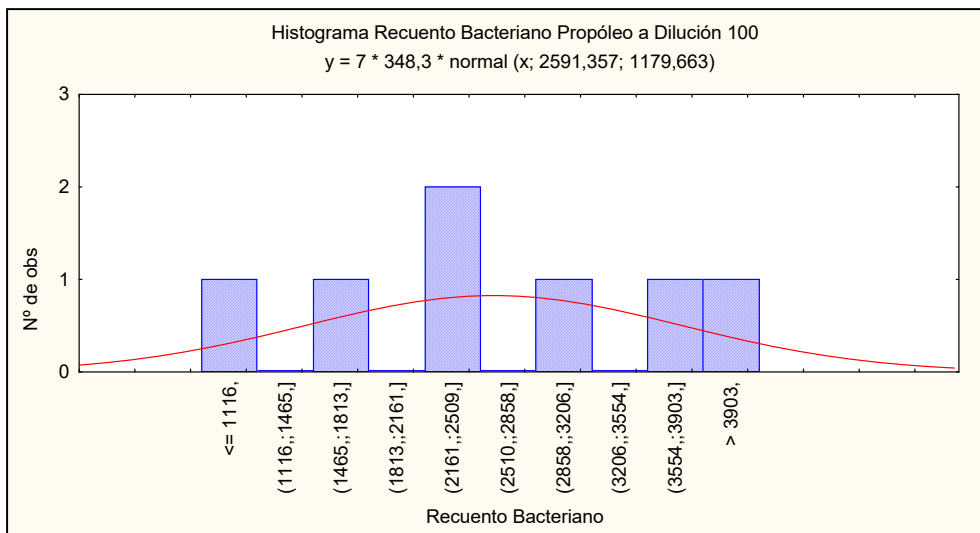
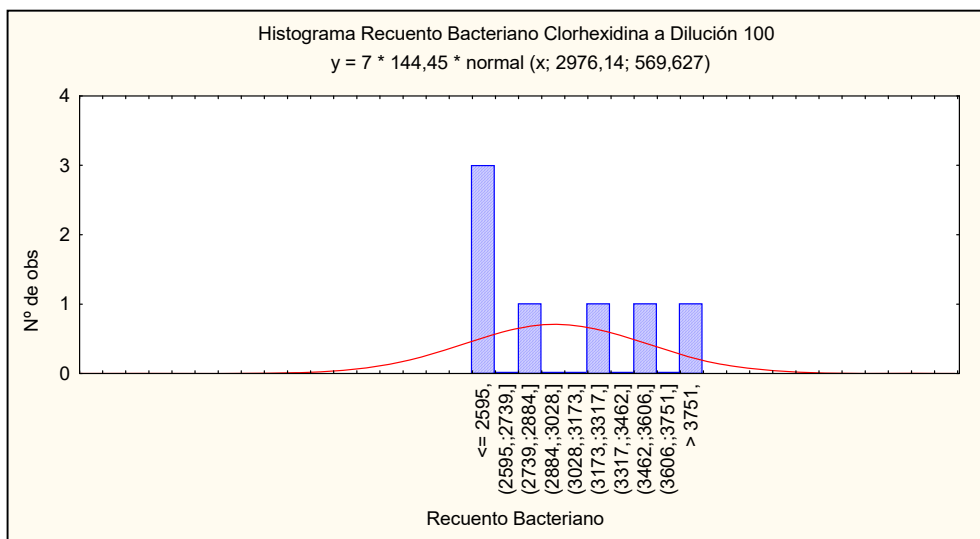


Gráfico 5: Histograma Recuento Bacteriano Clorhexidina a dilución 100.



Dilución 1000

Tabla IX: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas basal para cada uno de los colutorios a dilución 1000.

Muestra	Colutorio		
	Alcohol	Propóleo	Clorhexidina
1	2502	1404	1898
2	3200	1446	2832
3	2656	964	1708
4	658	2111	1310
5	2541	158	1591
6	2780	3416	3262
7	2918	3618	2345

Tabla X: Estadísticas Descriptivas de las muestras Basal a dilución 1000.

Colutorio	N	Media	Mínimo	Máximo	Desv. Estd
Alcohol	7	2464,928	657,5	3200	832,200
Propóleo	7	1873,714	157,5	3618	1268,493
Clorhexidina	7	2134,857	1310	3262	709,001

Se observa de la tabla 10 que la mayor desviación estándar la presenta el colutorio Propóleo, al igual que en el caso de la dilución 100.

A continuación se presentan los gráficos para cada uno de los colutorios, los tres fueron graficados en una misma escala de 0 a 5500 con la intención de compararlos, claramente se observa que las muestras correspondientes a Propóleo presentan una mayor desviación estándar por lo que las distribuciones de las muestras tanto de Alcohol como Clorhexidina están contenidas en ésta.

Gráfico 4: Histograma Recuento Bacteriano Alcohol a dilución 1000.

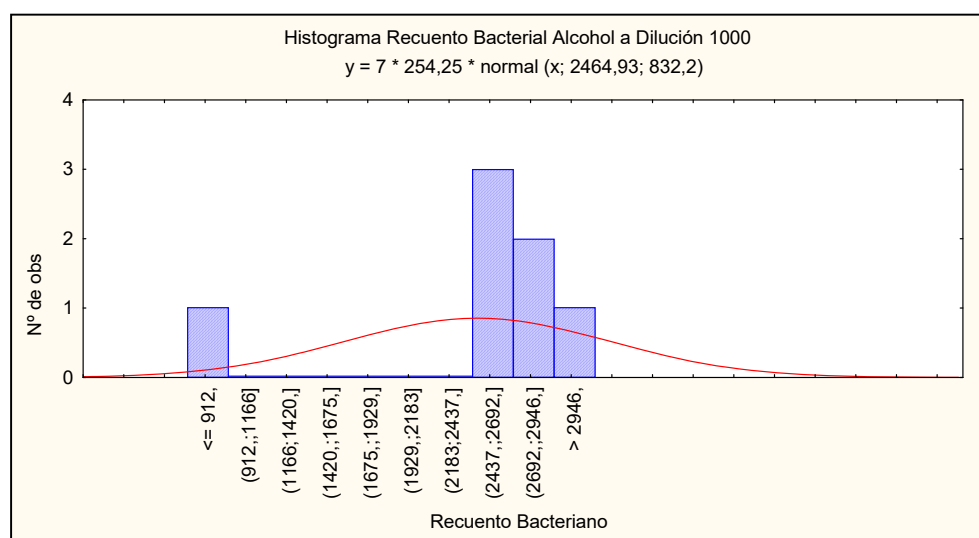


Gráfico 5: Histograma Recuento Bacteriano Propóleo a dilución 1000.

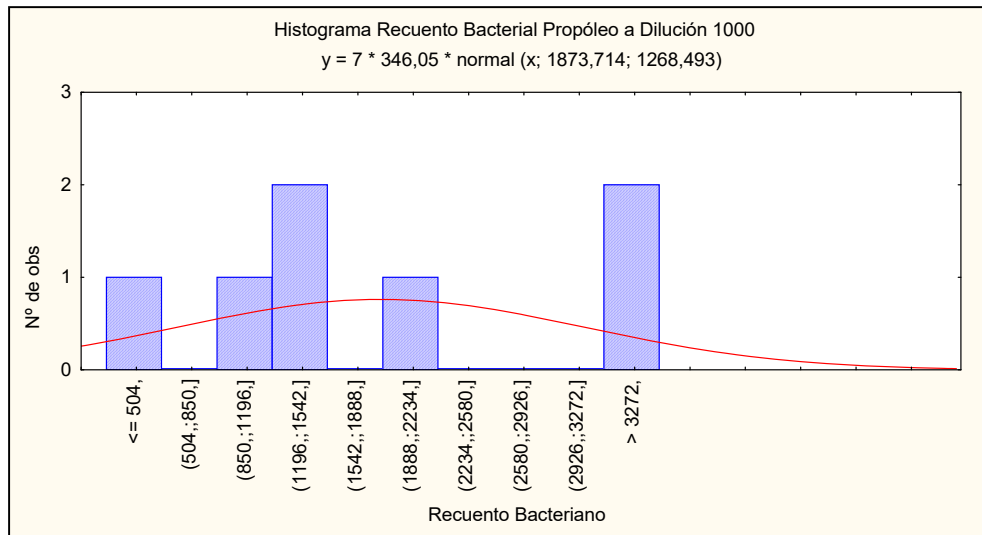
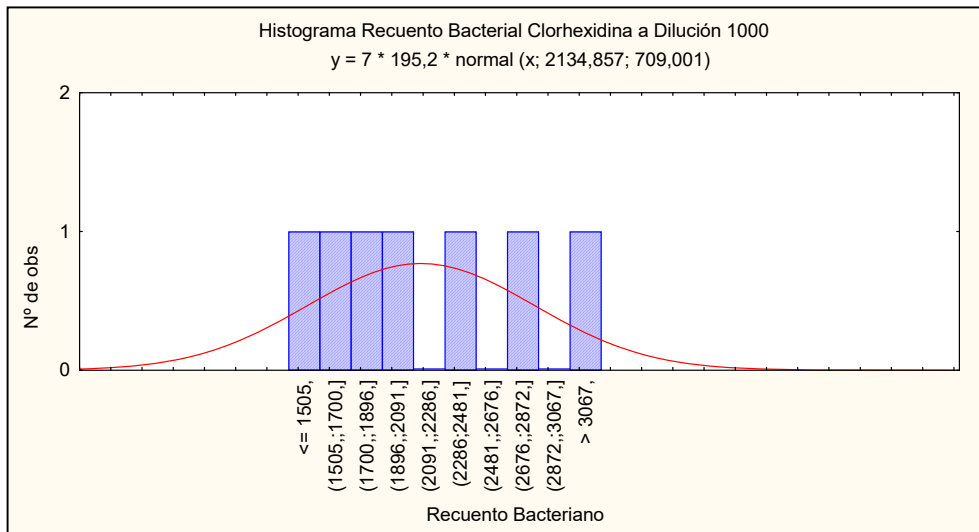


Gráfico 6: Histograma Recuento Bacteriano Clorhexidina a dilución 1000.



ANOVA

A continuación se realiza el Análisis de Varianza (anova), éste realiza un análisis de varianza, que somete a prueba la hipótesis según la cual las medias de varias muestras son iguales.

Análisis de Recuentos Bacterianos 10'**Dilución 100**

Tabla XI: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas a 10' para cada uno de los colutorios a dilución 100.

Muestra	Colutorio		
	Alcohol	Propóleo	Clorhexidina
1	2893	1166	1398
2	3490	1151	2543
3	2725	1255	382
4	2959	1217	920
5	3001	627	1590
6	3595	1690	1410
7	3337	3217	1873

Tabla XII: Estadísticas Descriptivas de las muestras a 10' a dilución 100.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Alcohol	7	22000	3142,785714	108973,82
Propóleo	7	10322	1474,5	686115
Clorhexidina	7	10115	1444,928571	469776,95

Tabla XIII: Análisis de Varianza ANOVA para las muestras de recuentos bacterianos 10', con los distintos colutorios a dilución 100.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Prom de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	13222464,7	2	6611232,333	15,680476	0,000114025	3,55455715
Dentro de los grupos	7589194,64	18	421621,9246			
Total	20811659,3	20				

Como el valor p obtenido 0,000114 es menor al nivel de significancia 0,05 se rechaza la hipótesis nula, es decir hay diferencias significativas entre los grupos, los resultados obtenidos con los distintos colutorios son diferentes.

Análisis de Recuentos Bacterianos 60'

Dilución 100

Tabla XIV: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas a 60' para cada uno de los colutorios a dilución 100.

<i>Muestra</i>	<i>Colutorio</i>		
	<i>Alcohol</i>	<i>Propóleo</i>	<i>Clorhexidina</i>
1	2751	1740	1389
2	2983	2095	1999
3	2400	1519	409
4	1392	1208	637
5	2986	465	1140
6	3478	1795	980
7	2775	3204	1204

Tabla XV: Estadísticas Descriptivas de las muestras a 60' a dilución 100.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Alcohol	7	18764	2680,571429	428798,0357
Propóleo	7	12024,5	1717,785714	704241,7381
Clorhexidina	7	7757	1108,142857	268286,0595

Tabla XVI: Análisis de Varianza ANOVA para las muestras de recuentos bacterianos 60', con los distintos colutorios a dilución 100.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	g.l.	Prom de los cuadrados	F	Probabilidad F	Valor crítico para F
Entre grupos	8799355,5	2	4399677,75	9,4189609	0,001587802	3,55455715
Dentro de los grupos	8407955	18	467108,6111			
Total	17207311	20				

Como el valor p obtenido 0,00158 es menor al nivel de significancia 0,05 se rechaza la hipótesis nula, es decir hay diferencias significativas entre los grupos, los resultados obtenidos con los distintos colutorios son diferentes. Por lo tanto, se procedió a realizar la prueba *t-student* para muestras independientes, debido a que éstas fueron tomadas a diferentes pacientes, considerando como variables los colutorios en las distintas tomas de muestras.

Comparación entre colutorios a dilución 100

Las hipótesis nula y alternativa son las siguientes

H_0 : No existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los recuentos bacterianos para la dilución 100 entre un colutorio X y un colutorio Y en un tiempo determinado.

H_1 : Existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los recuentos bacterianos para la dilución 100 entre un colutorio X y un colutorio Y en un determinado tiempo.

Tabla XVII: Comparación estadística entre los colutorios, para cada una de las muestras tomadas en distintos tiempos con dilución 100.

Colutorios	Valor P	
	Dilución 100	
	10'	60'
Alcohol v/s Propóleo	0,0001662	0,1055000
Propóleo v/s Clorhexidina	0,2436659	0,0057297
Alcohol v/s Clorhexidina	0,0000463	0,0000991

La tabla XVII entrega los valores p para cada comparación de los colutorios, si éste es menor que el nivel de significancia 0,05 se rechaza la hipótesis nula, es decir existen diferencias significativas entre las medias de los recuentos bacterianos.

Como se observa en la tabla no hay diferencia significativa entre las medias al comparar alcohol y propóleo a los 60 minutos, propóleo y clorhexidina a los 10 minutos, las demás comparaciones presentan diferencias significativas respecto de las medias.

Análisis de Recuentos Bacterianos 10'

Dilución 1000

Tabla XVIII: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas a 10' para cada uno de los colutorios a dilución 1000.

Muestra	Colutorio		
	Alcohol	Propóleo	Clorhexidina
1	2592	971	1134
2	2947	767	1051
3	2598	799	67
4	1190	850	194
5	2261	115	246
6	2593	1089	495
7	3207	2001	1554

Tabla XIX: Estadísticas Descriptivas de las muestras a 10' a dilución 1000.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Alcohol	7	17386	2483,714286	416180,24
Propóleo	7	6591	941,5714286	314719,37
Clorhexidina	7	4740,5	677,2142857	323789,65

Tabla XX: Análisis de Varianza ANOVA para las muestras de recuentos bacterianos 10', con los distintos colutorios a dilución 1000.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Prom de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad F</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	13326906,9	2	6663453,464	18,953792	0,00003717	3,55455715
Dentro de los grupos	6328135,57	18	351563,0873			
Total	19655042,5	20				

Dado que el valor p obtenido 0,00003717 es menor al nivel de significancia 0,05 se rechaza la hipótesis nula, es decir hay diferencias significativas entre los grupos, los resultados obtenidos con los distintos colutorios son diferentes.

Análisis de Recuentos Bacterianos 60'

Dilución 1000

Tabla XXI: Medias de Recuentos Bacterianos de cada una de las muestras tomadas a 60' para cada uno de los colutorios a dilución 1000.

<i>Muestra</i>	<i>Colutorio</i>		
	<i>Alcohol</i>	<i>Propóleo</i>	<i>Clorhexidina</i>
1	1944	1482	1139
2	3045	1543	1014
3	2100	686	353
4	916	1058	93
5	1871	112	246
6	2149	1352	235
7	3160	1940	1055

Tabla XXII: Estadísticas Descriptivas de las muestras a 60' a dilución 1000.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Alcohol	7	15184	2169,142857	577395,7262
Propóleo	7	8172	1167,428571	371454,369
Clorhexidina	7	4134	590,5714286	207586,7024

Tabla XXIII: Análisis de Varianza ANOVA para las muestras de recuentos bacterianos 60', con los distintos colutorios a dilución 1000.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Prom de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	8932194,7	2	4466097,333	11,58584	0,000583533	3,55455715
Dentro de los grupos	6938620,8	18	385478,9325			
Total	15870815	20				

Dado que el valor p obtenido 0,000583 es menor al nivel de significancia 0,05 se rechaza la hipótesis nula, es decir hay diferencias significativas entre los grupos, los resultados obtenidos con los distintos colutorios son diferentes, por lo que se procedió a realizar el t-student..

Comparación entre colutorios a dilución 1000

Las hipótesis nula y alternativa son las siguientes:

H_0 : No existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los recuentos bacterianos para la dilución 1000 entre un colutorio X y un colutorio Y en un tiempo determinado.

H_1 : Existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los recuentos bacterianos para la dilución 1000 entre un colutorio X y un colutorio Y en un determinado tiempo.

Tabla XXIV: Comparación estadística entre los colutorios, para cada una de las muestras tomadas en distintos tiempos con dilución 1000.

Colutorio	Valor P	
	Dilución 1000	
	10'	60'
Alcohol v/s Propóleo	0,0031435	0,1316959
Propóleo v/s Clorhexidina	0,0342745	0,0045360
Alcohol v/s Clorhexidina	0,0002353	0,0001277

Al igual que la tabla XVII ésta entrega los valores p para cada comparación de los colutorios pero a dilución 1000, si éste es menor que el nivel de significancia 0,05 se rechaza la hipótesis nula, es decir existen diferencias significativas entre las medias de los recuentos bacterianos.

Cabe destacar que los únicos colutorios que no presentan diferencia significativa en las medias son el alcohol y Propóleo a los 60 minutos, para los demás casos se rechaza la hipótesis nula, es decir existe diferencia significativa en las medias.

DISCUSIÓN

Actualmente el Propóleo a nivel Mundial ha atraído la atención de muchos investigadores del área de la salud, lo que se ve reflejado en la gran cantidad de publicaciones aparecidas en la última década, por lo cual la revisión y selección de información científicamente válida fue extensa y compleja.

El presente estudio evaluó la actividad antimicrobiana in vivo de un Propóleo de la zona central de Chile contra bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica, cuyo resultado puede ser extrapolable a otros Propóleos considerando que a pesar de que la composición puede variar dependiendo del origen la acción es similar, de acuerdo a lo comprobado por Duarte et al. (Duarte et al., 2003) y Feres et al. (Feres et al., 2005). La formulación utilizada fue como colutorio al 0,2%, ésta concentración fue elegida por demostrar efectividad en otros estudios de actividad antimicrobiana del Propóleo contra bacterias orales (Steinberg et al., 1996).

La CHX que en este estudio fue usada como control positivo, ha sido utilizada por más de dos décadas en investigaciones para ser comparada con nuevos productos que han ido surgiendo para el control químico del biofilm dental. Así por ejemplo, en el año 1990 Jenkins et al. realizaron un estudio evaluando la persistencia de la actividad antibacteriana de diversos productos utilizados para la higiene oral, realizando conteos de bacterias orales desde el recuento inicial hasta los 420 minutos, concluyendo que todos los productos testeados fueron significativamente superiores al placebo (suero) pero, menos efectivos que la CHX en la inhibición de bacterias (Jenkins et al., 1990). Este Seminario utilizó como control negativo etanol al 0,2% que corresponde a una concentración mayor que la contenida en la solución hidroalcohólica del Propóleo testada.

En el presente Seminario se realizó un estudio de diseño aleatorio paralelo a triple ciego para disminuir el sesgo que puede influenciar los resultados. Se trabajó con 21 pacientes con Periodontitis Crónica Moderada y Avanzada Generalizada diagnosticados de acuerdo a los criterios establecidos en el Workshop Internacional de la A.A.P. de 1999, que acudieron a la Clínica A de la Cátedra de Pre-grado de Periodoncia de la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso durante los meses de Mayo a Julio del 2006, con un rango de 35 a 67 años de edad (promedio de 46 años), y que cumplieron los criterios de inclusión, previo a un consentimiento informado (ver anexo 1). El análisis estadístico fue realizado con el programa *stadic* ® 5 edición 97 y se trabajó con un intervalo de confianza del 95%.

En este estudio se midieron los recuentos de UFC basales (t0), a los 10 (t1) y 60 minutos (t2) posteriores al enjuague. Luego los datos basales fueron registrados y analizados descriptivamente verificando que los participantes pertenecían al mismo Universo. Los datos obtenidos en t1 y t2 fueron sometidos al análisis Anova. Como los resultados obtenidos de este

análisis fueron significativos, es decir, existió diferencias entre los colutorios pero no se podía especificar cual era el distinto, se sometieron los datos a un t-student (ver resultados).

A partir de las diluciones 100 y 1000 se obtuvieron las muestras para siembra y posterior cultivo. Las siembras fueron realizadas en forma duplicada como respaldo en caso de que existiese una alteración de éstas por contaminación o error en el procedimiento.

De los datos promediados y registrados de la dilución 1:100 con los tres colutorios evaluados en t1 y t2 se observa que con el Propóleo si bien se produce una baja significativa de UFC en t1 semejante a la observada con CHX, en t2 éstas aumentan, a diferencia de la CHX que en t2 mantiene los niveles de UFC similares a t1. Lo anterior se puede explicar según Rölla por la sustantividad que presenta la CHX (Rölla et al., 1971), la que muestra una acción bacteriana persistente que dura más de doce horas (Schiott et al., 1970). Por otra parte, con respecto al Propóleo no fue posible encontrar estudios que evaluaran si éste presenta sustantividad. El comportamiento en el caso del etanol es bastante discreto presentando un bajo efecto microbicida sin significancia estadística ni en t1 ni en t2, lo que no puede ser atribuible a la baja concentración utilizada en este estudio. Gajardo et al., el año 2006 al evaluar la actividad antimicrobiana del etanol, solvente del Propóleo, contra *P. gingivalis*, concluyeron que a concentraciones entre el 0.2% y el 35% no inhibía el desarrollo bacteriano (Gajardo et al., 2006).

A partir de los datos promediados en la dilución 1:1000 se encuentra que si bien hay diferencias estadísticamente significativas entre la CHX y el Propóleo en t1 y principalmente en t2, la tendencia del Propóleo a la baja en el recuento de UFC expresada en la dilución 1:100 se mantiene (ver gráficos 1 y 2).

Steinberg et al. en 1996 realizaron un estudio con un diseño experimental similar al aplicado en esta investigación y demostraron que el Propóleo al 0.2% a los 10 minutos provocaba una disminución del 42% en el recuento de *S. Mutans*. En 1999 García et al. también midieron la actividad del Propóleo contra *Streptococo mutans* pero, además evaluaron su actividad sobre *A.a.* y *Cándida albicans* demostrando que el Propóleo inhibe a los tres microorganismos (García et al., 1999). Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación, con la salvedad de que en éste estudio el espectro bacteriano a evaluar fue más amplio, pues abarco la totalidad de bacterias anaerobias presentes en la saliva de pacientes con Periodontitis Crónica.

En un estudio in vitro en Brasil que ocupó una metodología similar al antibiograma se demostró que el Propóleo al 11% inhibe el crecimiento de bacterias salivales de forma significativamente superior a otros extractos naturales como la salvia y el clavo de olor, siendo sólo superado por el efecto de la CHX al 0.12% (Feres et al., 2005). El presente estudio ocupó una concentración de Propóleo que es aproximadamente 50 veces menor al estudio de Feres y se encontró que el Propóleo se comporta en forma similar a la CHX por lo menos durante los 10 primeros minutos. La diferencia entre los resultados de ambos trabajos podría deberse no sólo a la metodología, si no que talvez al superar cierta concentración el Propóleo no alcanzaría mayor actividad antibacteriana.

Swerts et al. evaluaron el efecto antibacteriano in vitro de soluciones de Propóleo y CHX a distintas concentraciones por separado y en asociación, en la desinfección de túbulos dentinarios, concluyendo que la combinación de las soluciones de Propóleo al 2.5% más CHX al 0,1% tuvieron un efecto sinérgico de potenciación (Swerts et al., 2005). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente Seminario, los mejores efectos antibacterianos del Propóleo se obtienen en los primeros minutos de aplicación por lo tanto se justificaría su utilización como irrigante y unido a la CHX se esperaría obtener un resultado antibacteriano en el tiempo debido a la sustantividad que presenta ésta última; por lo tanto el uso de esta combinación avalaría su uso como colutorio.

Ya en el año 2003 Escobar et al. concluyeron que la irrigación subgingival con Propóleo como coadyuvante en el tratamiento de Periodontitis Crónica genera mejorías en los parámetros clínicos y microbiológicos (Escobar et al., 2003). El presente estudio comprobó sólo la efectividad antibacteriana del Propóleo sobre microorganismos anaerobios mientras que en el de Escobar el efecto final puede atribuirse en parte a la acción antibacteriana y también a las otras propiedades del Propóleo tales como antiinflamatorio, cicatrizante, etc.

A diferencia de estudios realizados in vitro en los cuales se evalúa la efectividad del Propóleo frente a cepas bacterianas específicas tales como *P. gingivalis* (Gajardo et al., 2006), las cuales presentan un comportamiento muy distinto a aquellas que se encuentran insertas dentro de un ecosistema tan complejo como la cavidad bucal, éste Seminario mide la actividad del Propóleo en contra de bacterias que se desarrollan bajo diversas condiciones microambientales y en interacción con otros microorganismos. Es por esto que los resultados de la presente investigación adquieren mayor relevancia clínica, avalando su potencial uso en pacientes que padecen Periodontitis Crónica.

CONCLUSIONES

- 1.- EL extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% evaluado muestra actividad antimicrobiana contra bacterias anaerobias presentes en la saliva de pacientes con Periodontitis Crónica.
- 2.- El extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% muestra actividad antimicrobiana contra bacterias anaerobias presentes en la saliva de pacientes con Periodontitis Crónica similar a la CHX al 0.12% en los primeros 10 minutos.
- 3.- El extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% muestra actividad antimicrobiana contra bacterias anaerobias presentes en la saliva de pacientes con Periodontitis Crónica muy superior al etanol al 0.2% en todos los tiempos evaluados, por lo tanto se descarta la influencia antibacteriana que éste pueda ejercer como vehículo del extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2%.
- 4.- A partir de los 10 minutos el extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% decrece en su actividad antimicrobiana, en cambio la CHX al 0.12% es persistente en su acción durante los 60 minutos evaluados en nuestra investigación.

SUGERENCIAS

Actualmente el Propóleo a nivel Mundial ha atraído la atención de muchos investigadores, los cuales han centrado sus esfuerzos en el descubrimiento y comprobación de sus propiedades, así como su aplicación en otros campos de la Medicina.

Al observar los resultados obtenidos en este estudio, resulta interesante corroborarlos en futuras investigaciones contra bacterias aerobias y otros microorganismos patógenos como hongos o virus, así como su utilización en otras áreas de la odontología en las que sus múltiples propiedades sean aplicables y efectivas.

Sería de gran utilidad poder realizar nuevos estudios prospectivos en pacientes que estén en tratamiento periodontal y evaluar la mejoría clínica que pueda inducir el uso de este producto, además de analizar la posibilidad y constatar los efectos que pudiera ocasionar la asociación con otros agentes antimicrobianos.

Así mismo, sugerimos evaluar la eficacia y efectividad real de las distintas presentaciones del Propóleo disponibles en el mercado así como el sinergismo que puede establecerse con otros agentes antibacterianos de uso frecuente en Odontología.

Finalmente, no podemos dejar de mencionar lo necesario que es dar nuevas oportunidades para desarrollar proyectos en diversas áreas de la Odontología y poder realizar mayor cantidad de convenios u otros, que aporten recursos económicos y humanos, y de esta forma contribuir al crecimiento del aporte universitario a la investigación.

RESUMEN

Se realizó un estudio clínico experimental de diseño aleatorio paralelo a triple ciego para evaluar la actividad antimicrobiana in vivo de un extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% contra bacterias anaerobias presentes en la saliva de pacientes con Periodontitis Crónica. Se utilizó la CHX al 0.12% como control positivo y etanol al 0.2% como control negativo.

La muestra fue de 21 voluntarios diagnosticados con Periodontitis Crónica Moderada y Avanzada Generalizada, que acudieron a la Escuela de Odontología de la Universidad de Valparaíso.

De cada participante se obtuvo una muestra basal de saliva y posteriormente se enjuagaron por 30 segundos con uno de los colutorios al azar, obteniéndose las muestras a los 10 y 60 minutos.

Una vez obtenida las muestras se realizaron cultivos para bacterias anaerobias por 48 horas, realizándose luego el recuento de UFC. Se trabajó con medias de los recuentos de UFC para el análisis estadístico de los datos sometiéndolo al test Anova, dado que los resultados de éste fueron estadísticamente significativos se aplicó el t-student para muestras independientes con un intervalo de confianza de confianza del 95%.

El resultado obtenido indican que el extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% muestra actividad antimicrobiana similar a la CHX al 0.12% en los primeros 10 minutos, a partir de éste momento el extracto hidroalcohólico de Propóleo decrece en su actividad antimicrobiana, en cambio la CHX muestra una acción persistente en el tiempo. Por otra parte, el etanol al 0.2% no muestra actividad antimicrobiana en ninguno de los tiempos evaluados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addy, M. ; Moran, J. ; Newcombe, R. ; Warren, P. (1995): *The comparative tea staining potential of phenolic, chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses*. Journal of Clinical Periodontology. 22 : 923 - 928.

Albandar, J.M. (2005): *Epidemiology and risk factors of periodontal diseases*. Dental Clinics of North America. 49 (3): 517-532.

Amoros, M.;Lurton, E.;Boustic, J.; Sauvager, F.; Cormier,M.(1994).*Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-enyl caffeate*.J Nat Prod. 57:644-647

Asociación Española de Médicos Naturistas (AEMN). <http://www.medicina-naturista.net/> [Accesado el 29- 12- 2005].

Bankova,V.; Popov, S.; Mareko, N .(1983).*A study on flavonoids of propolis* . J Nat Prod. 46:471-474

Bankova, V. (2005): “Recent trends and important developments in propolis research”. [En línea], Evidenced – Based Complementary and Alternative Medicine Journal. 2(1):29-32. Disponible en <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/content/full/2/1/29> [Accesado el 3-12-2005].

Bascones, A. ; Manso, F. (1994) : *Clorhexidina en Odontoestomatología : Conceptos actuales y revisión de la literatura*. Avances en Odontoestomatología. 10 : 686 - 708.

Bonhevi, J.; Coll, F.;Jorda, R.(1994).*The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics*. J Am Oil Chem Soc. 71:529-532

Bretz, W.A.; Chiego, D.J. Jr.; Marcuccio, M.C.; Cunha, I.; Custodio, A.; Schneider. L.G. (1998): Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. Z. Naturforsch. 53 (11-12): 1045-1048.

Brown, P.;Nicolini, S.; Onetto, J.E. (1991): *Etiopatogenia de la caries – Caries*, Valparaíso-Chile, Ediciones de la Universidad de Viña del Mar. 16 -26.

Burdock, G.(1998): *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis*. Food and Chemical Toxicology, 36 :347-363

Chaillou (2004).*Estudio del Propóleos de Santiago del Estero.Argentina*.Cienc Tecnol Aliment Campinas. 24(1):11-15.

Cortelli, S.C.; Feres, M.; Rodrigues, A.; Aquino, D. R.; Shibli, J.A.; Cortelli, J.R. (2005): *Detection of Actinobacillus Actinomycetemcomitans in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis*. Journal of Periodontology 76 (2): 204-209.

Cummins, D. (1997) : *Vehicles : How to deliver the goods*, Periodontology 2000. 15 : 84-99.

Doodstar, H.; Burke, M.; Mayer, R.(2000).*Bioflavonoids:selective substrates and inhibitors for cytochromes P450 CYP1 and CYPB1*.Toxicology.144:31-38

Drago, L.;Mombelli, B.; Vecchi, E.; Fascina, M.; Tocalli ,M.; Gismondo,M. (2000). *In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract*. J Chemoterapy. 12:390-395

Duarte , S. ; Koo , H. ; Bowen , W. H. ; Hayacibara , M.F. ; Cury, J. A. ; Ikegaki, M.; Rosalen , P. (2003). *Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 26: 527-531.

Escobar, E.; Nautili, Alessandro.; Pugliesi, L. A.; Pinto, M.(2003): *Propolis Extract as an Adjuvant to Periodontal Treatment*. Oral Health Prev Dent. 1: 29-35.

Estrategia de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005 [pdf, En línea], Disponible en:http://sldcu/galerias/pdf/sitios/mednat/estrategia_de_la_oms_sobre_medicina_tradicional.pdf. [Accesado el 5-12-2005].

Feres, M. ; Figueiredo, L. ; Maroly, I. ; Barreto, Q.; Coelho, M. ; Werneck, M. (2005). *In vitro Antimicrobial Activity of Plant Extracts and Propolis in Saliva Samples of Healthy and Periodontally-Involved Subjects*. Journal of the International Academy of Periodontology. 7(3) : 90-96.

Fernandez, S.; Aleman, E.; Fiqueroa, B.; Fagoaga, E.; Rivera, J.; Purroy, A.(2004). *Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers*.Contact Dermatitis. 50:320-321

Fine, D. (1995): *Chemical agents to prevent and regulate plaque development* . Periodontology 2000. 8: 87-107.

Focht, J.; Hansen, S.H.; Nielsen, J.V.; Van den Berg-Segers . A.; Riezler, R. (1993): *Bactericidal effect of Propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infectiones*. Arzneimittelforschung. 43 (8): 921-930

Foward, G. ; James, A. ; Barnett P. ; Jackson, R. (1997) : *Gum health product formulations : what is in them and why ?*. Periodontology 2000. 15 :32-39.

Frías, J. ; Alsina, M. (2001) : *Temas de revisión. Nuevas perspectivas en biofilms dentales*. Periodoncia 2001. 11 : 23-29.

- Friskopp, J.; Isacson, C. (1984): *A quantitative microradiographic study of mineral content of supragingival and subgingival dental calculus*. Scandinavian Journal of Dental Research. 92:25–32.
- Gajardo, M. ; Pavez, V.; Montenegro, G.; Pizarro; R.; Del Río, P. (2006): *Actividad Biocida de un Propolis chileno frente a P.Gingivalis: Estudio in vitro*. Trabajo de investigación para optar al título de Cirujano-Dentista. Universidad de Chile.
- Gamonal, J. A.; López, N. J.; Aranda; W. (1998): *Periodontal conditions and treatment needs, by CPITN, in the 35-44 and 65-74 year-old population in Santiago, Chile*. International Dental Journal. 48 (2) : 96-103.
- García, T. A.; Lelis, R. B.; Santiago, W. K.; Santos, R.; Brandao, M.G.; Santos, V. R. (1999): *Atividades Antimicrobianas In Vitro de extractos de Própolis e Aroeira*. Arquivos em Odontología, Belo Horizonte. v. 35, suplemento, mai/jun.
- Gebara, E.; Lima, L.; Mayer, M. (2002): *Propolis Antimicrobial Activity against Periodontopathic Bacteria*. Brazilian Journal of Microbiology 33 (4).
- Genco, J. ; Goldman, H. ; Cohen, D. (1993) : *Saliva y cutículas dentales - Periodoncia*, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F. :125-129.
- Genco, J. ; Goldman, H. ; Cohen, D. (1993) : *Placa dental microbiana - Periodoncia*, Editorial Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F. :131-138.
- Greenaway, W. ; Scaysbrook, T. ; Whatley, F. R. (1990) : *The composition and plant origin of propolis : a report of work at Oxford*. Bee World 71. : 107- 118.
- Greenstein, G., Berman, Ch. ; Jaffin, R. (1986) : *Clorhexidine an adjunct to periodontal therapy*. J. Periodontology. 57 (6) :370-377.
- Gulbahar, O.;Ozturk, G.; Erdem, N.; Kazandi, A.; Kokuludag, A.(2005). *Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper*.Annals of Allergy. Asthma and Immunology. 94(4):509-511
- Havsteen, B.(2002).*The biochemistry and medical significance of the flavonoids*.Pharmacology &Therapeutics, 96(2-3): 67-202
- Hay, K.; Greig, D.(1990). *Propolis allergy:a cause of oral mucositis with ulceration*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol . 70(5):584-600
- Hegasi, A. (1997): *Propolis: an Overview*. In the International Symposium on Apitherapy,[pdf.], Cairo, 8 y 9 de Marzo, 1997.

Heo, M.; Sohin, J.; Au, W. (2001). *Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate*. Mutat Res. 488:135-150

Herrera, D. ; Roldán, S. ; Santacruz, I. ; Santos, S. ; Masdevall, M. ; Sans, M. (2003) : *Diferences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations : an in vitro contact test and salivary bacterial counts study*. Journal of Clinical Periodontology. 30 :307-314.

International Workshop for a Classification of Periodontal (1999) Diseases and Conditions. Ann Periodontol. Dec;4(1):i, 1-112.

Jenkins, S.; Addy, M. ; Newcombe, R. (1990): *The effects of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on salivary bacterial counts*. J Clin Periodontology. 17 (10): 698-701.

Jones, C. (1997) : *Clorhexidine : Is it still the gold standard ?*, Periodontology 2000. 15 :55-62.

Liébana, J. (2002) : *Determinantes Ecológicos Orales- Microbiología Oral* , Editorial Mc Graw-Hill Interamericana de España, 2º Edición. : 528-540.

Liébana, J. (2002) : *Microbiología de las Placas Dentales- Microbiología Oral* , Editorial Mc Graw-Hill Interamericana de España, 2º Edición. : 541-559.

Lindhe, Jan. (2003): *Antisépticos para el tratamiento Periodontal-* Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. Madrid, España. :466-480.

Lindhe, Jan. (2003): *Placa Dental y Sarro -* Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Editorial Médica Panamericana. Tercera Edición. Madrid, España. : 109-115.

Lineamientos Estratégicos del Plan de Salud Buco- Dental 2000-2010 [pdf, En línea], MINSAL. Disponible en: <http://www.minsal.cl> [Accesado el 29- 12- 2005].

Mandel, I. D. (1987): *The Functions of Saliva*. Journal of Dental Research. 66: 623-627.

Marcucci, M. C., (1995): *Propolis : Chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. Apidologie. 26 : 83-99.

Martínez- Flores, S.; Gonzalez- Gallego, J.; Culebras, J.; Muñón; M. J. Revisión: Los flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. (2002). [pdf.], Nutrición Hospitalaria. 17: 271-278.

Montenegro, G.; Peña, R.; Avila, G; Timmermann, B (2001). *Botanical origin and seasonal production of propolis in hives of Central Chile*. Bolm Bot Univ Sao Paulo . 6 : 19-25.

Muñoz, O.; Peña, R.; Ureta , E.; Montenegro, G.;Caldwell, C.;Timmermann, B.(2001). *Phenolic Compounds of Propolis from Central Chilean Matorral*. Z Naturforsch 56(3-4):273-277.

Muñoz, O.; Peña, R.; Ureta, E.; Montenegro, G.; Timmermann, B. (2001): *Propolis from Chilean Matorral Hives*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung 56 : 269 - 272.

Pader, M. (1998) : *Oral Hygiene Products and Practice*. Marcel Dekker, Inc. 319-329.

Pallasch, T. J. (1996): Pharmacokinetic principles of antimicrobial therapy. *Periodontology* 2000. 10: 5-11.

Pedersen, A.; Bardow, A.; Jensen, B.; Nauntofte, B. (2003). *Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion*. *Oral Diseases*. 8 (3) :117-129.

Perez, M. M.; Brito, F. ; Sologuren , M. (2000) : *Evaluación In vitro de la retención de tres distintos colutorios de Clorhexidina presentes en el mercado nacional*. Trabajo de investigación para optar al título de Cirujano-Dentista. Universidad de Valparaíso.

Popova, M.; Silici , S.;Kaftanoglu, O.;Bankova, V.(2005). *Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition*. *Phytomedicine*. 12(3)221-228

Quintana,J.; Rodríguez, O.;Díaz, M.; López, M.(1997). *Empleo de la tintura de propóleos al 5% en la cura de heridas sépticas faciales*. *Rev Cubana Estomatol*. 34(1): 25-27

Rateitchak, K.; Rateitchak, E.; Wolf, H. (1991): *Epidemiología e Indices – Atlas de Periodoncia*, Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Barcelona. España. : 34 - 40.

Reglamento para el ejercicio de las Prácticas Médicas Alternativas como Profesiones Auxiliares de la Salud y de los Recintos en que éstas se realizan. [En línea], MINSAL. Disponible en: http://www.minsal.cl/ici/medicinas_alternativas/medicina_alternativa.pdf [Accesado el 1-12-2005].

Ricciardelli, D.(1979). *Origine géographique de la propolis*. *Apidologie*. 10:241-267.

Rölla, G.; Loe, H.; Schiott, C.R. (1971): Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol*. 16 (9): 1109-1016.

Rölla, G. ;Melsen, B. (1975) : *On the Mechanism of the plaque inhibition by clorhexidine*. *J. Dent Res*. 54 :57-62.

Santos, A. (2003): *Evidence-based control of plaque and gingivitis*. Journal of Clinical Periodontology. 30 :13-16.

Santos, A. ; Bastos, E.; Uzeda, M.; Carvalho, M. ; Farias, L.; Moreira, E.; Braga, F.C. (2002) : *Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria*. Journal of Ethnopharmacology. 80 :1-7.

Sirinian, G.; Shimizu, T.; Sugar, C.; Slots, J.; Chen, C. (2002): *Periodontopathic bacteria in young healthy subjects of different ethnic backgrounds in Los Angeles*. Journal of Periodontology. 73 (3): 283-288.

Schiott, C.R.; Loe, H.; Jensen, S.B.; Kilian, M.; Davies, R.M.; Glavind, K. (1970): *The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora*. J Periodontal Res. 5 (2): 84-89.

Shafer, W.; Hine, M.; Levy, B. (1986): *Caries Dental*. Tratado de Patología Bucal. Nueva Editorial Interamericana, México D.F. : 415- 493.

Steinberg, D.; Galit, K.; Itzhak, G. (1996): *Antibacterial effect of Propolis and Honey on Oral Bacteria*. Am J Dent. 9: 236-239.

Stepanovic, S.; Antic, N.; Dakic, I.; Svabic-Vlahovic, S.(2003). *In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs*. Microbiol Res. 158:353-357.

Swerts, M.; Fiorini, J.E.; Sansone, C.; Pereira, A.; Groisman, S.; Dias-Costa, A. (2006): *Efeito in vitro da solução associada de própolis e clorexidina na desinfecção de túbulos dentinários*. [En Línea]. Disponible en http://iadr.confex.com/iadr/brazil05/preliminaryprogram/abstract_86298.htm [Accesado el 22-09-2006].

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

Uzel, A.; Sorkun, K.; Oncag, O.; Cogulu, D.; Gencay, O.; Salih, B. (2005): *Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples*. Microbiological Research. 160 : 189-195.

Valcic, S.; Montenegro, G. ; Mujica, A.M.; Avila, G. ; Franzblau, S. ; Singh , M. ; Maiese, W. ; Timmermann, B. (1999) : *Phytochemical, Morphological, and Biological Investigations of Propolis from Central Chile*. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung . 54 :406-416.

Yannai, S.; Day, A.;Williamson, G.;Rhodes, M.(1998).*Characterization of flavonoids as monofunctional or bifunctional inducers quinona reductasa in murine hepatoma cell lines*. Food Chem Toxicol. 36:623-630.

¿Qué es la Medicina Complementaria y Alternativa?. [pdf, En Línea], Centro Nacional de Medicina Complementaria y Alternativa, USA. Disponible en: <http://nccam.nih.gov/espanol/informaciongeneral/informaciongeneral.pdf> [Accesado el 12-12-2005].

ANEXOS

1.- Consentimiento Informado para participar en la etapa clínica del Seminario de Tesis para optar al título de Cirujano Dentista

“Actividad antimicrobiana in vivo de un extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% contra bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica”

El objetivo de este estudio es evaluar la actividad antimicrobiana in vivo de un extracto hidroalcohólico de Propóleo al 0.2% contra bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica, comparándolo con el gold Standard utilizado actualmente en Periodoncia, la Clorhexidina ; y descartando la acción que pueda ejercer el vehículo con el cual se prepara el colutorio a evaluar.

Para cumplir con el objetivo del presente Seminario de Tesis se procederá a:

1. Se tomaran muestras de 1 ml de saliva no estimulada, antes de realizar el enjuague con el colutorio a prueba.
2. Cada individuo realizará un enjuagatorio del colutorio a prueba.
3. Se tomaran nuevas muestras de 1 ml de saliva no estimulada a los 10 y 60 minutos luego de haber realizado el enjuagatorio.
4. El día en que se vaya a realizar la prueba, el individuo debe cumplir con las siguientes condiciones:
 - No debe usar ningún colutorio por lo menos una semana antes y durante el estudio (excepto el indicado el día correspondiente).
 - En el día de estudio sólo podrá ingerir agua antes del procedimiento.
 - No consumir chicles o caramelos en los tiempos de prueba.
5. Las muestras de saliva recolectadas serán utilizadas para cultivo y posterior recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Este estudio durará entre 6 y 8 semanas, siendo los días de pruebas los martes y miércoles, durante la jornada de la mañana (8:30 a 12:00 hrs.) en la clínica A de la facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, comenzando el día martes 2 de Mayo.

Este estudio no involucra ninguna clase de riesgos para el participante, en ninguna de sus etapas.

Yo _____ me comprometo a participar durante todas las etapas clínicas del Seminario de Tesis “*Actividad antimicrobiana in vivo de un Propóleo de la zona central de Chile contra bacterias anaerobias en saliva de pacientes con Periodontitis Crónica*”; aceptando los requisitos durante todo el estudio, realizando los enjuagues y asistiendo los días requeridos para llevar a buen término esta investigación.

Valparaíso, Mayo 2006.

2.- Composición de medios de transporte y de cultivo para anaerobios

Caldo de Tioglicolato (Transporte de anaerobios)

Fórmula en gramos por litro de agua destilada:

- Hidrolizado Pancreático de Caseína (Trypticase B-B-L) 15.0.
- L-Cistina 0.5.
- Glucosa 5.0.
- Extracto de Levadura 5.0.
- Cloruro de Sodio 2.5.
- Tioglicolato de Sodio 0.5.
- Resazurna 0.001.
- Agar 0.75.
- pH final 7.1 +/-.

Se prepara según fórmula original, repartir 10 ml en tubo de tapa rosca y se autoclava a 121°C por 15 minutos con tapas desatornilladas. A los tubos se le debe agregar una pequeña cantidad de Carbonato de Calcio (CaCO₂) aproximadamente 0.1 gr.

MEDIOS DE CULTIVO

Schaedler + 5% sangre cordero (anaerobios) Componentes:

- Caldo trypticase soya
- Bio-Polytone
- Glucosa
- Extracto de levadura
- Tris (hidroximetil) amino-metano
- Hemina
- L-cistina
- VitaminaK3
- Sangre cordero
- Agar

Utilización: medio reductor para el aislamiento de gérmenes anaerobios.

3.- Fotos tesis



Foto 1. Tubos de Ensayo con medio Tioglicolato para transporte de Anaerobios.



Foto 2. Tubos de ensayo con diluciones de las muestras de saliva.



Foto 3. Proceso de siembra en las placas.



Foto 4. Placas sembradas en la Jarra de Anaerobiosis.



Foto 5. Indicador de Anaerobiosis, introducción en la Jarra.

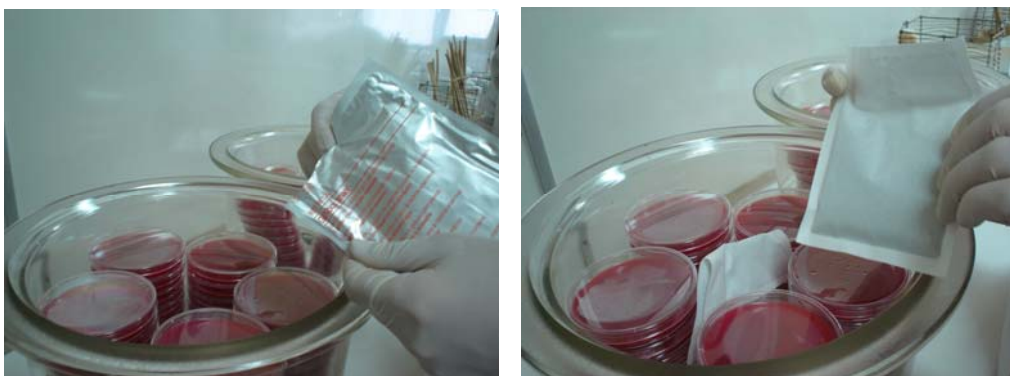


Foto 6. Generador de Anaerobiosis, apertura e introducción en la Jarra.



Foto 7. Jarras de Anaerobiosis en Sala de Cultivo.

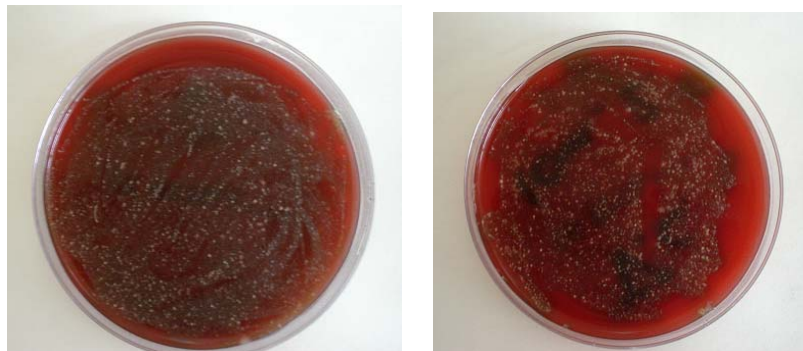


Foto 8. Cultivos basales de bacterias anaerobias.

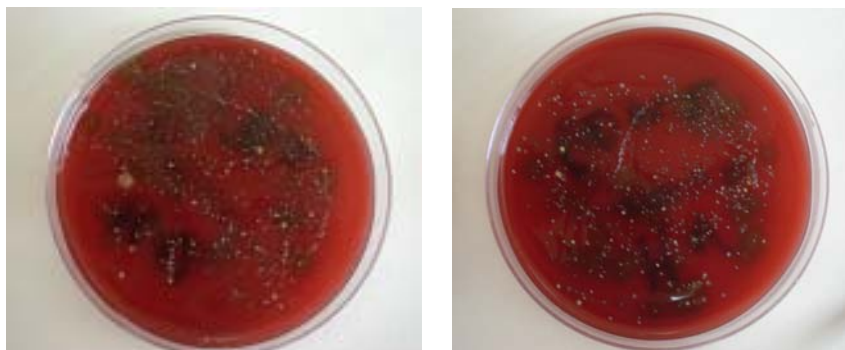


Foto 9. Cultivos de bacterias anaerobias a los 10 minutos post-enjuague.

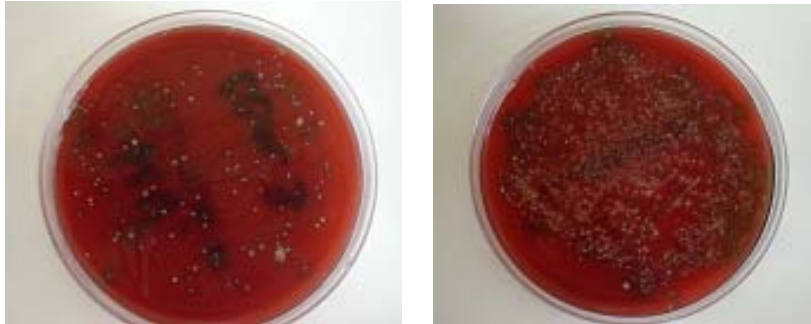


Foto 10. Cultivos de bacterias anaerobias a los 60 minutos post-enjuague.

FOTOS TESIS



Foto 1. Tubos de Ensayo con medio Tioglicolato para transporte de Anaerobios.



Foto 2. Tubos de ensayo con diluciones de las muestras de saliva.



Foto 3. Proceso de siembra en las placas.



Foto 4. Placas sembradas en la Jarra de Anaerobiosis.



Foto 5. Indicador de Anaerobiosis, introducción en la Jarra.

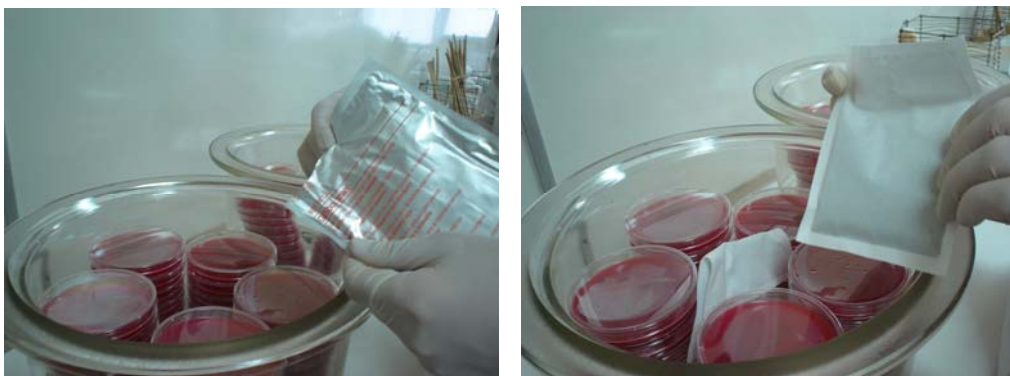


Foto 6. Generador de Anaerobiosis, apertura e introducción en la Jarra.



Foto 7. Jarras de Anaerobiosis en Sala de Cultivo.

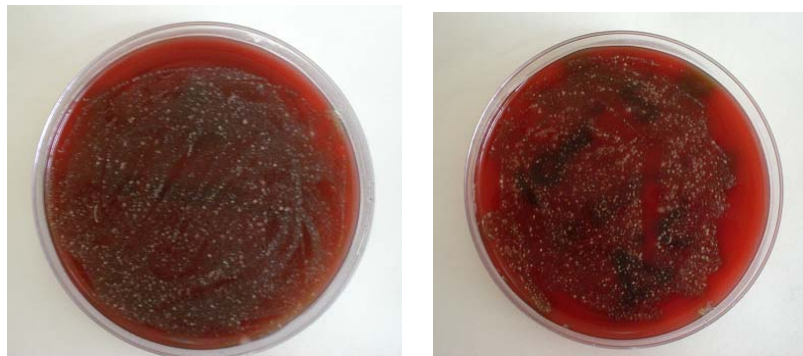


Foto 8. Cultivos basales de bacterias anaerobias.

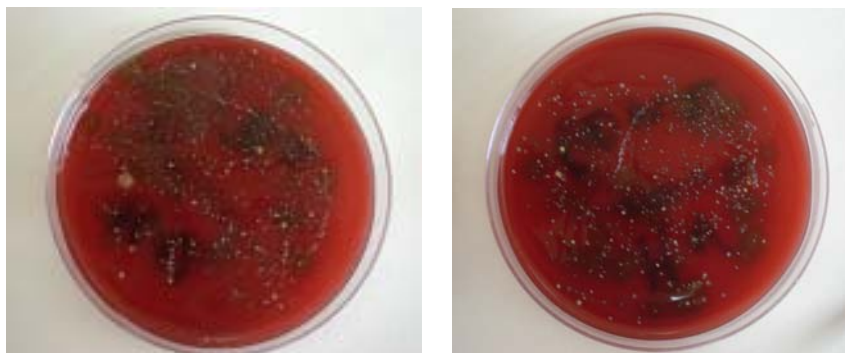


Foto 9. Cultivos de bacterias anaerobias a los 10 minutos post-enjuague.

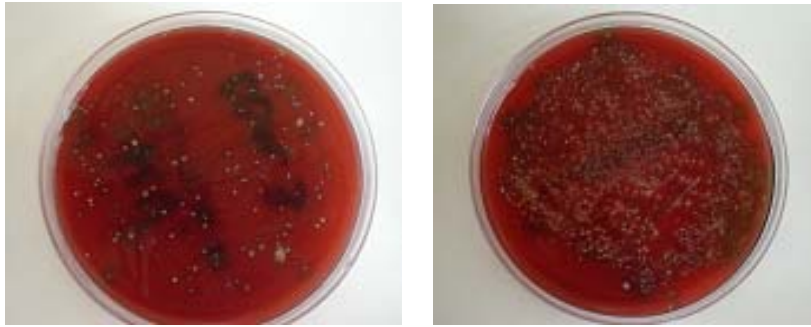


Foto 10. Cultivos de bacterias anaerobias a los 60 minutos post-enjuague.