



Inhibición de kéfir como prueba presuntiva en la evaluación de compuestos antimicrobianos

Alfonso Benítez de la Torre^{*1} , Iván Lenin Montejo Sierra² , Alberto Jerezano Domínguez³ 

¹Investigation, development and Quality Grupo México. Av. 16 ote. 323 Colonia Humboldt C.P. 72370 Puebla, Pue. México. ²Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” Universidad Matanzas, Cuba. ³Facultad de Estomatología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 31 pte. 1304 Puebla, Pue. México.

*Email autor para correspondencia: [*cee.uiapuebla.alfonso@gmail.com](mailto:cee.uiapuebla.alfonso@gmail.com)

Recibido: 23 enero 2023. **Aceptado:** 4 mayo 2023

RESUMEN

En este trabajo se describe un método para evaluar la efectividad de sustancias inhibitorias de crecimiento microbiano utilizando la propiedad del kéfir para acidificar la leche. Se evaluó la capacidad de tres enjuagues bucales comerciales y de un extracto etanólico de propóleo para inhibir bacterias ácido lácticas presentes en el kéfir a través de la cuantificación del ácido láctico que producen en 10 horas, observándose propiedades inhibitorias del extracto de propóleo superior a las obtenidas con enjuagues comerciales que contenían eucaliptol-mentol, clorhexidina y bencidamina ($p < 0.05$). Se corrobora el uso potencial del propóleo en aplicaciones odontológicas y se concluye que la capacidad metabólica de las bacterias acidulantes del kéfir puede ser aprovechada para realizar pruebas presuntivas, sencillas y de bajo costo en la búsqueda de compuestos que inhiban el crecimiento de bacterias.

Palabras clave: Acidificación de leche; curvas de titulación; placa dentobacteriana.

ABSTRACT

In this work, a method to evaluate the effectiveness of microbial growth inhibitory substances using the property of kefir in milk acidification is described. The capacity of three commercial mouthwashes and an ethanolic extract of propolis to inhibit lactic acid bacteria present in kefir, was evaluated through the quantification of lactic acid produced in 10 hours, observing inhibitory properties of the propolis extract higher than those obtained with commercial rinses that contained eucalyptol-menthol,

chlorhexidine and benzydamine ($p<0.05$). The potential use of propolis in dental applications is corroborated and it is concluded that the metabolic capacity of kefir acidulant bacteria can be used to perform presumptive, simple, and low-cost tests in the search for compounds that inhibit the growth of bacteria.

Keywords: Dental-bacterial plaque; milk acidification; titration curves.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales están consideradas como uno de los principales problemas de salud, de ellas, las caries y las enfermedades periodontales son de las más infecciosas y prevenibles [1]. Según reportes de la OMS [2], entre el 60 y 90 % de la población escolar, y casi el 100 % de los adultos presentan alguna afección bucal, siendo más evidente en personas en situación de pobreza, edad avanzada y discapacidad. Las enfermedades bucodentales afectan a cerca de 3,500 millones de personas en todo el mundo, y de ellas 2,000 millones padecen de caries dental [3]. Las enfermedades bucales están relacionadas con diversas afecciones de salud, como problemas de digestión y nutrición, nacimientos con bajo peso, enfermedades cardíacas, fatiga muscular, aterosclerosis y trombosis entre otras [4,5,6,7], por lo que la salud bucal debería de ser un tema prioritario de salud pública que requiere estrategias enfocadas a concientizar y educar a la población para su correcta atención, pero más importante aún para su prevención [8], lo que implica un enorme reto para mejorar los hábitos alimenticios, el acceso de la población a servicios de salud oral acordes a sus posibilidades económicas, aumentar la

capacitación sobre el uso correcto del cepillo, pasta, hilo dental y enjuagues bucales, continuar en la búsqueda de mejores técnicas de limpieza así como en el desarrollo y evaluación de nuevos productos de higiene.

La cavidad bucal se caracteriza por proporcionar un medio ideal para el crecimiento microbiano, siendo la placa dentobacteriana la evidencia más clara de su desarrollo y su relación con enfermedades periodontales. De aquí la importancia de controlarla, y en la medida de lo posible prevenirla. Actualmente se sabe que el método más eficiente para el control de la biopelícula dental es por medios mecánicos (cepillado, hilo, palillo dental), el uso de enjuagues bucales con agentes microbicidas (clorhexidina, flúor, aceites esenciales de origen vegetal) o la combinación de ambos [9].

Los enjuagues bucales o “colutorios” son productos que contienen agentes antimicrobianos que contribuyen a mejorar la efectividad de la limpieza tradicional [10], combatir la halitosis [11] y remover la placa dentobacteriana [12]; además de que también contribuyen a hacer más agradable el cepillado y reforzar hábitos de higiene al dejar un sabor y sensación de frescura. Aunque existe una

amplia variedad de enjuagues bucales disponibles en el mercado, su uso es limitado, lo que se puede explicar por falta de hábitos de higiene, su precio, y los efectos secundarios asociados a su uso prolongado como el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, cambios en la microbiota natural, tinción de los dientes [1], alteraciones del sabor (en especial de lo salado) y cambios de sensibilidad de la lengua [13], lo que sugiere la necesidad de buscar alternativas más eficientes, seguras, accesibles, económicas, y en la medida de lo posible, más naturales.

El propóleo ha sido ampliamente estudiado por sus propiedades antibacterianas con un alto potencial de uso en aplicaciones odontológicas [14]. Lo elaboran enzimáticamente las abejas (*Apis mellifera*) para cubrir, sellar, reparar y proteger sus colmenas [15] a partir de la mezcla de resinas y néctar de plantas. Contiene flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos [16], y aunque varían enormemente en su composición debido a que provienen de diferentes fuentes vegetales, en general todos presentan efectos antimicrobianos, siendo los extractos etanólicos los más estudiados [17,18,19].

Existen diferentes métodos para evaluar la efectividad inhibitoria de una sustancia. Los métodos cuantitativos de laboratorio (*in vitro*) evalúan la disminución del crecimiento de bacterias patógenas ya sea por conteo directo de las unidades formadoras de colonia (UFC) en placas con agar, la densidad óptica en tubos de ensayo, o los halos de inhibición de las

bacterias expuestas a las sustancias con supuesta acción inhibitoria en comparación a controles de acción conocida [20,21,22]. Por otra parte, las pruebas clínicas evalúan de manera cualitativa en un número significativo de pacientes el grado de higiene bucal, la presencia de placa dentobacteriana, aftas o inflamación de encías, expresadas en diferentes indicadores como el índice de placa (IPL), de sangrado (IB) y gingival (IG) [23]. Todos estos métodos tienen, en mayor o menor medida, inconvenientes de costo, disponibilidad de cepas puras, equipos y de los conocimientos especializados requeridos.

De manera indirecta, pero con una baja inversión en equipo, reactivos y manejo de cepas microbianas, la cuantificación de la producción de ácido láctico por cepas de kéfir, puede utilizarse de manera preliminar en la búsqueda de inhibidores de patógenos: el método se fundamenta en la similitud del kéfir, o “leche búlgara”, con las bacterias bucales, ya que ambos ecosistemas se componen de complejas interacciones donde cohabitan géneros de *Lactobacillus* sp. y *Streptococcus* sp. capaces de sintetizar un biofilm que les sirve como soporte para su crecimiento [24], sintetizan ácidos orgánicos a partir de azúcares simples (acidogénicas) además de que producen y sobreviven a pH ácido (acidófilas) [25], propiedad que puede ser aprovechada para monitorear su crecimiento mediante técnicas sencillas de titulación con indicadores. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la inhibición de la producción del ácido láctico que produce el kéfir, evaluando un extracto

etanólico de propóleo y tres enjuagues bucales comerciales, como prueba presuntiva en la búsqueda de compuestos inhibitorios de patógenos bucales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas se hicieron en los Laboratorios Multiusos de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, localizados en la calle 31 poniente número 1304 de la ciudad de Puebla, México durante los meses enero a octubre del año 2022. Las características de los enjuagues bucales comerciales evaluados, así como del propóleo y del agua oxigenada utilizadas como control positivo utilizadas en el presente trabajo se

presentan en el cuadro 1.

Activación del kéfir

Se pesaron 150 gramos de kéfir (peso húmedo) enjuagados con leche comercial Nutrileche® y se dejaron escurrir sin presión durante 15 minutos en una coladera. Posteriormente se pasaron a un frasco de vidrio con tapa con 150 ml de la misma leche y se dejaron fermentar por una hora a temperatura ambiente (18 a 20 °C). Después de este tiempo se separaron los nódulos de kéfir con coladera, se titularon 2 ml de la leche acidificada comprobando que la acidez estuviera entre 100 y 150 grados Dornic (°D), y el producto obtenido se utilizó como inóculo.

Cuadro 1. Contenido declarado de los productos evaluados y del control positivo.

Tratamiento	Principio activo	Contenido reportado
Enjuague 1	Bencidamina 0.15%	No reporta fórmula completa. Sólo que tiene sabor mentol.
Enjuague 2	Digluconato de Clorhexidina 0.12%	Agua, sorbitol, pantenol, hidroxietilcelulosa, PEG-40, aceite de ricino hidrogenado, cocamidopropil betaina, poloxámero 188, alantoína, sacarina sódica, aroma.
Enjuague 3	Eucaliptol 0.092% y Mentol 0.042%	Agua, alcohol 21.6%, sorbitol, salicilato de metilo 0.06%, timol 0.064%, poloxámero 407, ácido benzoico, sacarina sódica, benzoato de sodio, verde 3.
Tintura de Propóleo	Propóleo	Extracto alcohólico de propóleo.
Agua oxigenada	Peróxido de Hidrógeno (11 vol. O ₂)	Agua desmineralizada, acetanilida y ácido fosfórico.

Cuadro 2: Arreglo experimental (ml)

	Leche	Inóculo	H ₂ O	H ₂ O ₂	Enjuague/propóleo
Control (-)	30	2	2	0	0
Control (+)	30	2	0	2	0
Enjuagues/propóleo	30	2	0	0	2

Fermentación

Los tratamientos se prepararon por triplicado adicionando 30 ml de leche a 38±2 °C y 2 ml del inóculo en tubos Falcon de 50 ml, así como agua potable (para el control negativo), peróxido de hidrógeno (control positivo), los enjuagues bucales y el propóleo (tratamientos experimentales) conforme al arreglo descrito en el cuadro 2, cuantificando la acidez inicial de cada tubo, y se incubaron por 10±2 horas a 38±4 °C.

Titulación

Después de 10 horas de fermentación a temperatura controlada se determinó la acidez producida en cada tubo, conforme a la NOM-F-420-S-1982 [32] con las siguientes modificaciones: con pipeta volumétrica se tomó una alícuota de 2 ml en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se adicionaron 50 ml agua destilada y 3 gotas (0.15 ml) de solución etanólica de fenolftaleína al 1 % y se tituló con NaOH 0.1N agitando de forma circular el matraz para facilitar la reacción ácido-base. Se registró el volumen necesario para obtener una coloración rosa tenue estable, y los valores obtenidos se expresaron en grados Dornic, donde 1 °D equivale al volumen (ml) de NaOH 0.1N utilizados para hacer virar 2 ml de cada

tratamiento con fenolftaleína hasta un color rosado tenue permanente.

Interpretación y análisis estadístico de resultados

Un mayor contenido de ácido láctico indica una menor capacidad de la sustancia evaluada para inhibir el crecimiento del kéfir, mientras que, si el contenido en ácido láctico es bajo, será indicativo de inhibición. Los experimentos se hicieron tres veces en días distintos y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con la prueba t de Student.

Curvas de titulación

Considerando que la determinación del punto de vire durante la titulación es un tanto subjetiva al depender de la apreciación del investigador, los resultados obtenidos se corroboraron mediante curvas de titulación conforme al procedimiento descrito por Escobar *et al.*, [26] pero con las siguientes modificaciones: por triplicado se midieron volumétricamente 10 ml de cada tratamiento en un vaso de precipitado de 50 ml y se obtuvo la lectura inicial de pH con un potenciómetro HANNA®. Se retiró el vaso de precipitado para agregar 1 ml de NaOH 0.1N con pipeta automática y trasvasar el contenido a un matraz Erlenmeyer de 250 ml para facilitar su agitación

circular. El contenido se regresó al vaso de precipitado y se tomó la lectura de pH después de 30 segundos. El procedimiento de agregar NaOH y tomar la lectura de pH se repitió hasta aumentar en dos unidades el valor inicial de pH de cada tratamiento. Los valores de pH obtenidos se registraron y graficaron contra el volumen de NaOH agregado.

Interpretación de resultados

Las curvas de titulación varían según la cantidad de compuestos presentes en la solución, en este caso ácido láctico que se produce durante el crecimiento microbiano y que reaccionan con el titulante (NaOH 0.1 N). Una menor cantidad de ácido láctico será indicativo de mayor inhibición, y la curva obtenida será más corta y con una pendiente más pronunciada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de inhibición del crecimiento del kéfir. Se observa que el experimento es válido considerando que hubo una inhibición del kéfir con peróxido de hidrógeno (control positivo), es decir, no hubo aumento de acidez a las 10 horas con respecto a la lectura antes de la fermentación, valor de acidez de 10 ± 2 °D que corresponde a una fórmula láctea fresca [33], mientras que, para el control negativo (con agua potable), hubo una máxima actividad metabólica y por lo tanto una acidificación significativa de la leche que llegó a valores de 50 ± 2 °D ($p < 0.5$).

Los mejores resultados se observaron para la

solución etanólica de propóleo con un 82% de inhibición en comparación a la obtenida con H₂O₂. Los enjuagues con clorhexidina y eucalipto-mentol resultaron estadísticamente menos efectivos que el propóleo ($p < 0.05$) con un 31.5 % del resultado obtenido con H₂O₂. El enjuague con bencidamina fue el menos efectivo y estadísticamente diferente a los dos enjuagues anteriores ($p < 0.05$).

En la figura 2 se presentan las curvas de titulación para los tratamientos evaluados. Nuevamente se observa una mínima cantidad de compuestos producidos en presencia de peróxido de hidrógeno y una máxima producción de ácidos en el control negativo (agua potable) que validan el presente experimento.

En México existen muchos recursos vegetales con potencial uso en aplicaciones médicas por sus propiedades antimicrobianas. Esta técnica, aunque puede ser considerada como presuntiva y no definitiva, podría servir para analizar, tanto en campo como en laboratorio, muchas muestras en poco tiempo y a bajo costo. Aunque es necesario validar con otras pruebas el método aquí presentado, los resultados obtenidos permiten inferir el comportamiento de *Streptococcus* sp. y *Lactobacillus* sp. ante compuestos antimicrobianos en condiciones reales considerando que ambas especies se encuentran en los biofilms del kéfir y de la boca [27]. Como ventajas del método propuesto se puede mencionar su sencillez, que no se requiere invertir tiempo para esterilizar, ni gastos de equipo, reactivos, cepas o medios de cultivo, no se corre el riesgo de manejar cepas



patógenas, y es relativamente fácil conseguir distribuidores de los reactivos necesarios. La prueba también puede tener otras aplicaciones,

como en la evaluación de toxicidad de contaminantes acuosos, o para detectar la presencia de antibióticos en la leche.

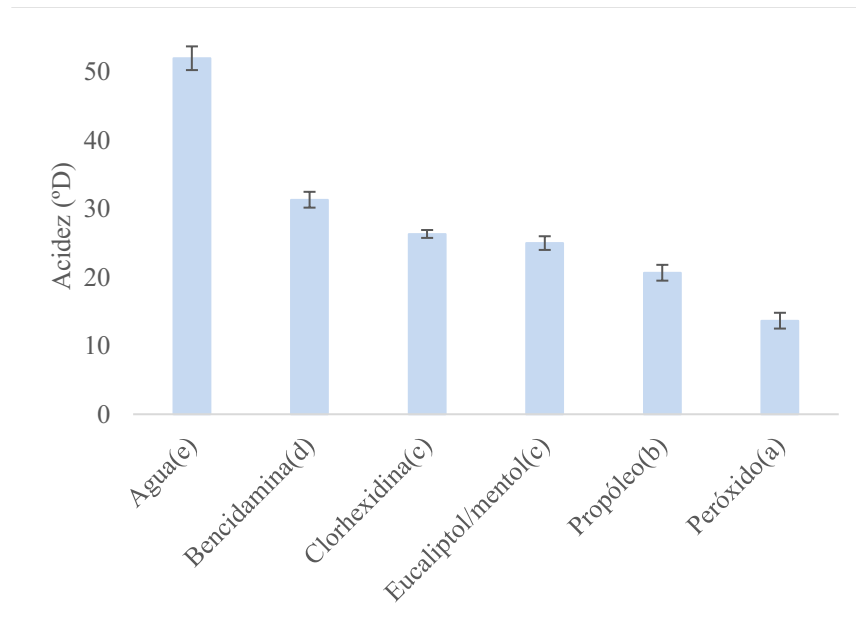


Figura 1. Inhibición de la fermentación leche por kéfir (10 h) con propóleo y enjuagues bucales comerciales. Letras entre paréntesis diferentes debajo de cada columna indican diferencia significativa (t Student $p < 0.05$).

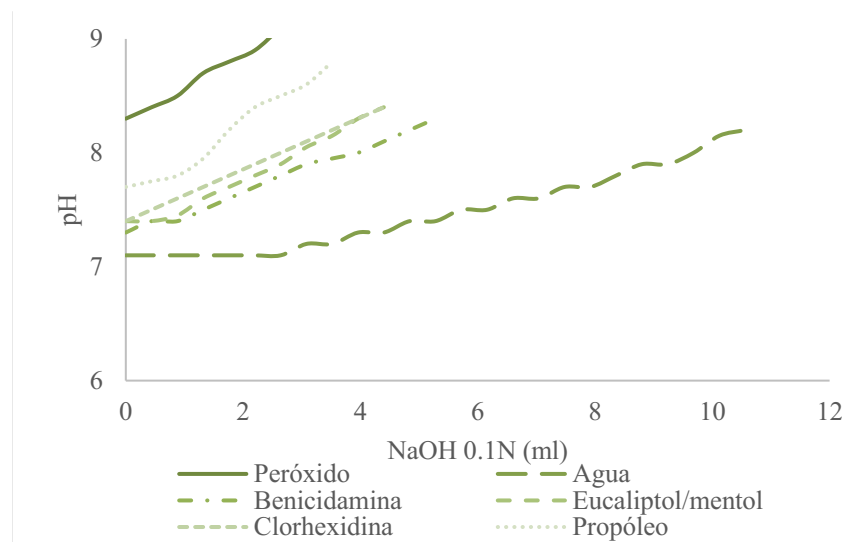


Figura 2. Curvas de titulación de leche fermentada por kéfir (10 h) utilizando propóleo y enjuagues bucales como agentes inhibidores de crecimiento microbiano en comparación con un control de agua y de peróxido de hidrógeno.

En este trabajo se obtuvieron valores de acidificación para la leche con peróxido de hidrógeno de 9 ± 3 °D que demuestran, indirectamente, la inhibición del crecimiento de los microorganismos presentes en el kéfir, y que corresponde a la acidez de la leche cruda recién ordeñada [28]. Los valores de máxima acidificación obtenidos en este trabajo (50 °D en 10 h) utilizando kéfir como inoculante, son muy bajos comparados con los reportados por Taco y García-Godos [31] quienes reportan valores de acidez de hasta 90 °D en la elaboración de leche ácida utilizando cepas puras de *Lactobacillus acidophilus*, y que probablemente se obtendrían si se prolongara el tiempo de fermentación, o se utilizaran cepas certificadas por su capacidad de acidificación; no obstante, el rango de 10 a 50 °D permitió observar diferencias estadísticamente significativas al evaluar la efectividad tanto del propóleo como de los enjuagues bucales comerciales.

Con respecto a las curvas de titulación, se observó que, a mayor ácido láctico producido por el kéfir, se requiere mayor volumen de NaOH 0.1N para lograr incrementar el pH, validando los resultados del primer experimento. En un trabajo similar, Escobar *et al.*, [26] determinaron el efecto del ácido hipocloroso en la modificación de la capacidad de amortiguamiento de pH por la saliva mediante curvas de titulación, lo que respalda la metodología utilizada, y valida los resultados obtenidos.

Se observó una mayor efectividad del extracto

etanólico de propóleo que la clorhexidina en la inhibición de la fermentación láctica con kéfir, resultado que concuerda con los obtenidos por Eguizábal y Nakata [14] para la inhibición de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* con propóleo peruano al 0.8 %, mientras que Dantas *et al.*, [29] reportan actividad antibacteriana de soluciones al 6.25 % de propóleo semejante a la clorhexidina en la inhibición de *S. mutans*. No obstante que diversos autores han demostrado la efectividad del propóleo como agente inhibidor del crecimiento bacteriano, es importante mencionar que, como ha sido reportado por Rodríguez *et al.*, [30] existe una gran variedad de propóleos en cuanto a su composición y por lo tanto en la acción bactericida y bacteriostática que limita su uso práctico en la formulación de productos medicinales. Interesante resulta el hecho de que el enjuague a base de eucaliptol y mentol, compuestos de origen vegetal, resultó más efectivo en la inhibición de la fermentación láctica con kéfir que la clorhexidina y bencidamina, lo que motiva a seguir evaluando más recursos naturales con potencial para combatir enfermedades bucales, así como métodos más sencillos para obtenerlos.

CONCLUSIÓN

Los resultados de las pruebas de inhibición del crecimiento de kéfir evaluando la producción de ácido láctico por titulación, demuestran la factibilidad del método en la búsqueda de compuestos inhibitorios de patógenos bucales. Se observaron propiedades positivas del



extracto etanólico de propóleo superiores estadísticamente a los obtenidos por enjuagues bucales comerciales que corroboran el potencial de este compuesto en aplicaciones odontológicas. Se sugiere profundizar en los resultados obtenidos para demostrar la correlación de la técnica propuesta con métodos tradicionales de evaluación de inhibición microbiana.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no hay conflicto de interés.

AGRADECIMIENTOS

A la BUAP y a IDQ grupo México por facilitar las instalaciones, equipo y reactivos necesarios para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- [1]. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2013; 10(5):210-29. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC33847409/>.
- [2]. Organización Mundial de la Salud. Salud Bucodental. 2012; Nota informativa No. 318.
- [3]. Organización Mundial de la Salud. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. World Health Organization. 2022; ISBN: 978-92-4-

006148-4. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061484>.

[4]. Rosado A, Hernández M, Pérez R. Evidencias científicas de la relación entre periodontitis y enfermedades cardiovasculares. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2008; 20(3):173–81. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852008000300005

[5]. Wolff F, Ribotta E, Jofre M. Riesgo de complicaciones perinatales en embarazadas con periodontitis moderada y severa, en la ciudad de Córdoba. *Revista clínica periodoncia, Implantología y Rehabilitación oral*. 2010; 3:73–8. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-01072010000200003&script=sci_arttext

[6]. Castaños J; Tejedor B, Sanz Y. Salud oral y rendimiento deportivo. 2012; Docplayer. Disponible en: <https://docplayer.es/16504309-Salud-oral-y-rendimiento-deportivo-javier-castanos-borja-tejedor-yolanda-sanz-de-paz.html>.

[7]. Aguilar-Méndez S, Quintero-Justo J, Ruiz-Alfonzo A, Cabrera-Cantú F, Quintero-Hernández V, Juárez-González V, *et al.* Los microorganismos orales y su relación con las enfermedades sistémicas: ¿qué tan informados estamos? *AyT BUAP*, 2021; 6(23), 93-113. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/15113>

[8]. Secretaría de Salud. Manual de Educación y Prevención para Promover y Mejorar la Salud



Bucal de la Población por Grupos de Edad en relación al “Apéndice A Normativo”. 2015; NOM-013-SSA2-2015. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/data/file/416059/Docto_SaludBucal_CENAPRECE_28nov18.pdf.

[9]. Serrano-Granger J, Herrera D. La placa dental como biofilm: ¿Cómo eliminarla?. RCOE, 2005; 10(4), 431-439. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138-123X2005000400005&lng=es&tlng=es.

[10]. Villalobos O, Salazar C, Ramírez G. Efecto de un enjuague bucal compuesto de *Aloe vera* en la placa bacteriana e inflamación gingival. Acta Odontológica Venezolana, 2001; 39(2), 16-24. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652001000200004&lng=es&tlng=es.

[11]. Ademovski S., Lingstrom P, Winkel E., Tangerman A, Persson G, Renvert S. Comparison of different treatment modalities for oral halitosis. Acta Odontologica Scandinavica, 2012; 70:224-33. Disponible en: <https://doi.org/10.3109/00016357.2011.635601>

[12]. Binney A, Aday M, Newcombe B. The Plaque Removal Effects Single Rinsings and Brushings. J. Clinical Periodontology, 1993; 64: 181-185. Disponible en: <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.3.181>

[13]. Maanen-Schakel V, Slot N, Bakker E, Weijden Van den. The effect of an oxygenating agent on chlorhexidine-induced extrinsic tooth

staining: a systematic review. Int J Dent Hyg, 2012; 10:198-208. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2012.00555.x>

[14]. Eguizábal M, Morom H. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Odontol. Sanmarquina, 2007; 10(2): 18-20. ISSN: 1560-9111. Disponible en: <https://doi.org/10.15381/os.v10i2.3028>

[15]. Rodríguez I, Tavares V, Pereira S, da Costa F. Antiplaque and antigingivitis effect of *Lippia sidoides*. A double-blind clinical study in humans. J. Appl. Oral Sci., 2009;17(5):404-407. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1678-77572009000500010>

[16]. Premoli G, Laguado P; Díaz N, Romero C, Villarreal J, González A. Uso del Propóleo en odontología. Acta Odontológica Venezolana. 2010; 48(2). Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art-23/>.

[17]. Krol W, Scheller S, Czuba Z, Matsuno T, Zydowicz G, Shani J, *et al.* Inhibition of *Neutrophils chemiluminescence* by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. J Ethnopharmacol. 1996; 55(1): 19-25. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874196014663>

[18]. Majien D, Trumbeckait S, Gronovien D, Ivanauskas L, Gendrolis A. Investigation of



chemical composition of propolis extract. *Medicina Kaunas*. 2004; 40(8): 771-774. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15299997/>.

[19]. Lazebnik, L., Dubtsova E, Kasianenko V, Komissarenko I. Composition and some biological effects of propolis. *Eksp Klin Gastroenterol*.2006; (2):112-116. Disponible en:

<https://europepmc.org/article/med/16866274>

[20]. Barón M, Quiñones Y. Actividad bactericida de *Castela texana* sobre bacterias relacionadas a caries dental y gingivitis. *Revista Iberoamericana de las Ciencias de la Salud*. 2013; ISSN: 2395-8057. Disponible en: <https://www.rics.org.mx/index.php/RICS/articula/view/18>

[21]. Caicedo J, Mayorga F, Montaña V, Salazar M, Armas A. Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de la cáscara, pulpa y semilla de uva (*Vitis vinifera*) sobre *Streptococcus mutans*, estudio *in vitro*. *KIRU*. 2018; 15(2): 77- 80. Disponible en: <https://doi.org/10.24265/kiru.2018.v15n2.03>.

[22]. Díaz T, Mendoza R. Efecto de la *Stevia rebaudiana* en el crecimiento del *Streptococcus mutans*. *KIRU*, 2021; 18(3): 147- 152. Disponible en: https://core.ac.uk/display/483714854?source=1&algorithmId=15&similarToDoc=232089740&similarToDocKey=CORE&recSetID=868705f0-56a0-445a-bb51-654e2e1ab295&position=5&recommendation_type=same_repo&otherRecs=228575190,53020981,483380391,386432476,483714854.

[23]. Rojas J, García A, López A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2005; 4(2)28-32. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85640204.pdf>

[24]. Han X, Li-Juan Z, Hui-Ying W, Yi-Fan W, Sai-Nan Zhao Z. Investigation of microorganisms involved in kefir biofilm formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018; 111(12):2361-2370. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30043188/>.

[25]. Rodríguez-Figueroa J, Noriega-Rodríguez J, Lucero-Acuña A, Tejeda-Mansir A. Avances en el estudio de la bioactividad multifuncional del kéfir. *Interciencia*. 2017; 42(6) 347-354. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33951621003.pdf>.

[26]. Escobar G., Diego F, Buitrago D, Trujillo D, Calderón J, Lafaurie G. Efecto de enjuagues de ácido hipocloroso sobre el pH de la saliva: estudio *in vitro*. *Universitas Odontológica*. 2015; 34(72)19-26. ISSN: 0120-4319. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231242734010>.

[27]. Panthee B, Gyawali S, Panthee P, Techato K. Environmental and Human Microbiome for Health. *Life*, 2022; 12(456). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-1729/12/3/456>.

[28]. Páez L, López N, Salas K, Spaldiliero A, Verde O. Características físico-químicas de la



leche cruda en las zonas de Aroa y Yaracal, Venezuela. Científica 1282). 2002. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/pdf/614/61412208.pdf>

[29]. Dantas de Almeida R, Dias de Castro R, Vieira M, Queiroz de Paulo M, Pereira J, Nascimento P. Efeito Clínico de solução antiséptica a base de Própolis em crianças cárie activas. Pesq Bras Odontoped Clin Integr, João Pessoa. 2006; 6(1):87-92. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-437408>

[30]. Rodríguez-Pérez B, Canales-Martínez M, Penieres-Carrillo J, Cruz-Sánchez T. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. Acta Universitaria 30, e2435. 2020. Disponible en: <http://doi.org/10.15174.au.2020.2435>.

[31]. Taco KR, García-Godos P. Optimización de parámetros para la elaboración de leche

ácida con *Lactobacillus acidophilus*. Información tecnológica, 2021; 32(1), 179-186. Disponible en:

https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642021000100179&script=sci_arttext&tlng=pt.

[32]. Norma Oficial Mexicana NOM-F-420-S-1982, productos alimenticios para uso humano - Determinación de acidez en leche fluida, así como el Aviso de la Declaratoria de Vigencia. Disponible en: https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4761014&fecha=02/09/1982#gsc.tab=0.

[33]. Avella C, Gutiérrez A, Palacio J. Elaboración de una bebida láctea a base de leche semidescremada deslactosada enriquecida con micronutrientes para personas mayores de 40 años de edad. Alimentos Hoy. 2021. Disponible en: <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/viewFile/588/450>.