

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



TESIS

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN ENJUAGUE BUCAL
ELABORADO A BASE DE EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO
FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Y *Porphyromonas gingivalis*
ATCC 33277. ESTUDIO IN VITRO. TACNA, 2020”.**

AUTOR

Yaeyin Duvaly Vargas Gonzales

<https://orcid.org/0000-0002-2531-3025>

ASESOR

Dr. Marco Antonio Sánchez Tito

<https://orcid.org/0000-0001-5886-9372>

Para optar por el título profesional de:

Cirujano Dentista

Tacna - 2024

DEDICATORIA

A mi familia y padres por ser mi mayor soporte y motivación para seguir adelante en cada paso de mi carrera profesional.

A mis abuelitos en el cielo, quienes formaron parte fundamental de mi desarrollo como persona y quienes espero estén muy orgullosos de mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su constante apoyo, paciencia y confianza en mí, en cada paso de mi carrera universitaria. En especial a mi mamá por su esfuerzo y dedicación para sacarme adelante en mis estudios.

A mi asesor Mag. C.D. Esp. Marco Sánchez Tito por su tiempo, paciencia, consejos y guía durante la ejecución de mi proyecto de Tesis.

A la Mg. CD. Esp. Karina Portugal Motocanche por estar presente y brindarme su ayuda durante la realización del presente trabajo.

Al Microbiólogo Edwin Obando Velarde por sus enseñanzas, tiempo y dedicación en cada paso de la parte experimental de la investigación.

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Vargas Gonzales, Yaeyin Duvaly, en calidad de Bachiller de la Escuela Profesional de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, identificado con DNI 72289875, declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

“ ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN ENJUAGUE BUCAL ELABORADO A BASE DE
EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO FRENTE A Streptococcus mutans ATCC 25175
Y Porphyromonas gingivalis ATCC 33277. ESTUDIO IN VITRO. TACNA, 2020. ”

Asesorada por Dr. Marco Antonio Sánchez Tito, la cual presente para optar el: Título Profesional de Cirujano Dentista.

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, habiéndose respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra los derechos de terceros.

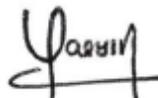
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a La Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra.

En consecuencia, me hago responsable frente a La Universidad de cualquier responsabilidad que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello a favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.



DNI:72289875

Fecha: 08-05-2024

RESUMEN

Objetivo: Demostrar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal elaborado a base de extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. **Material y método:** El diseño de la investigación fue de tipo experimental, in vitro. La caracterización química se realizó por medio de una marcha fitoquímica, seguida de una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó el método de Kirby Bauer para evaluar la sensibilidad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo (EEP) y del enjuague bucal a base del mismo. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del EEP. **Resultados:** El extracto etanólico derivado de propóleo evidenció en su composición la presencia de ácido gálico (10.1994µg/ml) y ácido clorogénico (412.8975 µg/ml). La CMB del extracto etanólico de propóleo que se utilizó fue de 30.537mg/ml. El enjuague bucal a base de EEP demostró formar halos de inhibición de mayor tamaño ($p < 0,05$) ante *S. mutans* ATCC 25175 (29,7 mm) y *P. gingivalis* ATCC 33277 (28,395 mm) que la Clorhexidina al 0,12 % (18,28 mm). **Conclusiones:** Existen diferencias entre el efecto antibacteriano del enjuague bucal a base de EEP y Clorhexidina al 0,12 % ante las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Palabras clave: Actividad antibacteriana; Enjuague bucal; Propolis

ABSTRACT

Objective: To demonstrate the antibacterial activity of a mouthwash made from an ethanolic extract of propolis against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. **Material and method:** The research design was experimental, in vitro. The chemical characterization was carried out by means of a phytochemical march, followed by a high performance liquid chromatography (HPLC). The Kirby Bauer method was used to evaluate the antibacterial sensitivity of the ethanolic extract of propolis (EEP) and of the mouthwash based on it. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the EEP were determined. **Results:** The ethanolic extract derived from propolis showed in its composition the presence of gallic acid (10.1994µg/ml) and chlorogenic acid (412.8975 µg/ml). The MBC of the ethanolic extract of propolis that was used was 30.537mg/ml. The EEP-based mouthwash demonstrated to form larger inhibition halos ($p < 0,05$) against *S. mutans* ATCC 25175 (29,7 mm) and *P. gingivalis* ATCC 33277 (28,395 mm) than 0,12 % Chlorhexidine (18,28 mm). **Conclusions:** There are differences between the antibacterial effect of the EEP-based mouthwash and 0,12 % Chlorhexidine against the strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Keywords: Antibacterial activity; Mouthwash; Propolis

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I.....	12
EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	13
1.1 Fundamentación del Problema	13
1.2 Formulación del Problema	14
1.3 Objetivo de la Investigación.....	15
1.3.1 Objetivo General	15
1.3.2 Objetivos Específicos.....	15
1.4 Justificación.....	15
CAPÍTULO II	17
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Antecedentes de la investigación.....	18
2.2 Marco Teórico	21
2.2.1. Propóleo	22
2.2.1.1 Composición química del propóleo	22
2.2.1.2 Propiedad antibacteriana del propóleo.....	23
2.2.1.3 Aplicaciones del propóleo en la Odontología.....	24
2.2.2 Actividad bacteriana de la cavidad bucal	25
2.2.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	25
2.2.2.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	26
CAPITULO III.....	27
HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES.....	27
3.1 Hipótesis.....	27

3.2 Operacionalización de las variables	27
CAPITULO IV	28
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	28
4.1 Diseño de la Investigación	28
4.1.1 Diseño	28
4.1.2 Tipo de investigación.....	28
4.1.3 Ámbito de estudio	28
4.1.4 Muestra y Unidad de Estudio.....	29
4.1.4.1 Criterios de inclusión.....	29
4.1.4.2 Criterios de exclusión	29
4.1.5 Materiales de laboratorio	29
4.1.5.1 Equipos	29
4.1.5.2 Materiales de vidrio	30
4.1.5.3 Medios de cultivo, bacterias y reactivos.....	30
4.1.5.4 Otros.....	30
4.1.6 Instrumento de recolección de datos.....	31
CAPÍTULO V.....	32
PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS.....	32
5.1 Procedimientos y métodos.....	32
5.1.1. Obtención del propóleo.....	32
5.1.2. Preparación del extracto etanólico de propóleo.....	32
5.1.3. Obtención de las concentraciones de extracto etanólico de propóleo .	33
5.1.4 Caracterización físico-química	34
5.1.5 Obtención de las cepas.....	34
5.1.6 Preparación de los medios de cultivo	34
5.1.7 Activación de las cepas bacterianas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	35

5.1.8 Sensibilidad bacteriana (método de Kirby Bauer) al extracto etanólico de propóleo ante las cepas <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	36
5.1.9 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	37
5.1.10 Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMB)	41
5.1.11 Elaboración del enjuague bucal a base de propóleo	41
5.1.12 Sensibilidad bacteriana (método de Kirby Bauer) al enjuague bucal a base de extracto etanólico de propóleo ante las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 en comparación con la Clorhexidina al 0.12%	43
5.2 Análisis de datos.....	45
CAPÍTULO VI	46
RESULTADOS.....	46
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES.....	61
RECOMENDACIONES.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones del extracto etanólico de propóleo en los discos ante las cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 y <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277.....	33
Tabla 2. Norma para la preparación de los medios de cultivo.....	35
Tabla 3. Distribución de la solución madre, suspensión bacteriana y BHI en los tubos de ensayo.....	40
TABLA 4. Valores descriptivos y prueba para igualdad de medianas.....	46
TABLA 5. Verificación de normalidad de los datos.....	48
TABLA 6. Valores descriptivos y análisis de varianza.....	49
TABLA 7. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	51
TABLA 8. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277.....	52
TABLA 9. Resultados de la concentración mínima bactericida (CMB) en diferentes concentraciones ante <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	53
TABLA 10. Resultados de la concentración mínima bactericida (CMB) en diferentes concentraciones ante <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277.....	53
TABLA 11. Resultados de los halos de inhibición del enjuague bucal a base del extracto etanólico de propóleo ante <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (SM) y ante <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 (PG).....	54
TABLA 12. Pruebas de normalidad para las muestras del enjuague bucal a base del extracto etanólico de Propóleo ante <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (SM) y ante <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 (PG).....	56
TABLA 13. Prueba para análisis de varianza, T-Student, para las muestras independientes entre el enjuague bucal a base de extracto etanólico de Propóleo y Clorhexidina al 0.12% ante <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama de caja del extracto etanólico de Propóleo en diferentes concentraciones: 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml, 26.1 mg/ml, 28.71 mg/ml, 31.32 mg/ml ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175. 47
- Figura 2.** Diagrama de caja del extracto etanólico de Propóleo en diferentes concentraciones: 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml, 26.1 mg/ml, 28.71 mg/ml, 31.32 mg/ml ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. 49
- Figura 3.** Diagrama de caja del enjuague bucal a base del extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 (SM) y ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (PG). 54

INTRODUCCIÓN

La caries dental y la enfermedad periodontal son unas de las razones más frecuentes por las que el paciente acude a una consulta odontológica; dado al malestar e incomodidad que producen en la salud dental del mismo. Esto a causa de la alteración del medio bucal donde la presencia de bacterias específicas tiene un rol fundamental en el avance de ambas afecciones. Para el control en la aparición de estas, se tiene conocimiento que el cuidado en la higiene dental es una de las primeras medidas a tomar en cuenta, centrándonos así en la importancia de la prevención, y no solo del tratamiento cuando ya se produce una extensión y progresión de las mismas. Dentro de las medidas de higienización que se conocen, una de ellas es el empleo de enjuagues bucales, cuyo propósito principal es disminuir la carga viral en el medio, además prevenir y reducir el acúmulo de placa dental.

Es así que el estudio sobre nuevos biomateriales naturales ha ocupado gran relevancia, dado a las características no solo antimicrobianas y antiinflamatorias que estos puedan presentar, sino también a los pocos efectos adversos y bajo o nulo nivel de toxicidad que presentan. Dentro de esa diversidad encontramos al propóleo, mezcla resinosa que producen las abejas y que se caracteriza por tener propiedades terapéuticas, antimicrobianas, anticancer y antivirales; y del cual se viene investigando sobre su variada aplicación en la odontología como resultado de las propiedades que posee.

Por ello el presente proyecto de investigación tiene como objetivo demostrar la actividad antibacteriana del enjuague bucal elaborado a base del extracto etanólico de propóleo ante las cepas que están involucradas en el inicio y progreso tanto de la caries dental y de la enfermedad periodontal, siendo estas el *S. mutans* y *P. gingivalis*. Así a través de la efectividad antibacteriana que se demuestre motivar e incentivar a futuras investigaciones donde se pueda utilizar el enjuague bucal a base del extracto etanólico de propóleo como una posible alternativa complementaria que se use en la prevención, manejo y tratamiento de estas enfermedades, mejorando así la calidad de salud dental en las personas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Fundamentación del Problema

Enfermedades infecciosas como la caries dental y la afección gingivoperiodontal son algunos de los problemas más comunes en salud dental, principalmente debido a su causa multifactorial. Donde la afección gingivoperiodontal esta originada por bacterias presentes en la placa dental, cuyo diagnóstico se da a partir de lo que el paciente reconoce como señales de alerta, en vista de ello deben crearse las condiciones adecuadas en base a su gravedad y severidad (1); mientras que la caries es un proceso patológico complejo donde existe una interacción durante un lapso de tiempo de tres agentes principales: el huésped susceptible, una flora oral cariogénica y un sustrato apropiado.(2)

Sin embargo, ambas afecciones son primordialmente el resultado de un desbalance en la composición y actividad del biofilm, que se produce por la presencia de microorganismos bacterianos específicos.

Tal como el *Streptococcus mutans*, que es el más investigado en la caries por su participación en la enfermedad, su marcada capacidad acidogénica y acidúrica que están presentes en el avance de la lesión cariosa (3), por otro lado la *Porphyromonas gingivalis* es el agente causal más asociado a la periodontitis (4) e involucrado en su progresión.

Por consiguiente, para tratar estas afecciones se utilizan múltiples alternativas de tratamientos como la remineralización de la pieza hasta la preparación cavitaria y posterior restauración, así también destartrajes, raspados y alisados radiculares, cirugías periodontales entre otros; todas estas opciones dadas para eliminar el agente infeccioso, pero cuando la progresión del mismo ha avanzado.

Una correcta higiene bucal es una de las formas para prevenir y enfrentar este tipo de problemas de manera temprana; para ello contamos con distintas

medidas preventivas, una de ellas es el empleo de enjuagues bucales a concentraciones específicas, como por ejemplo la Clorhexidina al 0.12%. Algunos de estos no suelen generar mayor efecto en el medio bucal, ya que algunos pacientes suelen presentar factores sistémicos que inhabilitan o disminuyen su acción, modificando el comportamiento de las bacterias y generando una resistencia ante el agente antibacteriano.

Por ello la investigación con productos naturales ha aumentado en el área dental, buscando algunos nuevos con menor toxicidad, mayor biocompatibilidad, mejoría en las actividades farmacológicas y además asociados con costos asequibles para la población (5). Uno de estos es el propóleo, sustancia de cera y resina producida por las abejas, que tiene notables efectos antimicrobianos, antiinflamatorios y anticariogénicos, que lo reafirman como fuente de incremento en la salud bucal por sus principios biológicos y fuerte efecto inhibitorio en una gran variedad de organismos patógenos (6,7).

Las preparaciones a base del propóleo tienen una amplia gama de aplicaciones dentro de la odontología, por la riqueza de sus componentes que tienen propiedades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antiinflamatorias y analgésicas (7).

El propóleo proporciona una opción para el mantenimiento y promoción de la salud, debido a ello estudios adicionales son necesarios para validar si los productos a base de él son iguales o superiores a los convencionales, para reducir la infección oral, placa dental y estomatitis (8). Ha sido demostrado que la adición de propóleos a enjuagues bucales mejora su actividad antimicrobiana y disminuye la acumulación de placa, siendo eficaz para el tratamiento de gingivitis (9).

Por esta razón es conveniente determinar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal elaborado a base de propóleo en comparación con otros, porque podrá servir como una nueva alternativa terapéutica que pueda no solo ser solo eficiente, sino complementario a otras medidas preventivas.

1.2 Formulación del Problema

¿Cuál será la actividad antibacteriana de un enjuague bucal elaborado a base de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277?

1.3 Objetivo de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Demostrar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal elaborado a base de extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

1.3.2 Objetivos Específicos

- I. Establecer la sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de propóleo usando la escala de Duraffourd y Lapraz ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 por el método de difusión en disco Kirby-bauer.
- II. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.
- III. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.
- IV. Establecer la sensibilidad bacteriana del enjuague a base de extracto etanólico de propóleo con la escala de Duraffourd y Lapraz ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, comparándola con Clorhexidina al 0.12%.

1.4 Justificación

Afecciones como la caries y enfermedad gingivoperiodontal están presentes con frecuencia en la mayoría de personas, por su variada etiología; donde una correcta higiene bucal tiene un rol importante como medida preventiva para el mantenimiento de la salud dental. Dentro de estas, la utilización del enjuague contribuye al control de la actividad bacteriana en el medio bucal, ya que la alteración en este es el principal desencadenante de la progresión de estas afecciones infecciosas.

Este proyecto busca la elaboración de un enjuague bucal elaborado en base a una alternativa más natural como es el propóleo, mezcla resinosa elaborada por las abejas, la cual ha sido estudiada con anterioridad comprobando una variedad de propiedades, siendo una de ellas la antibacteriana, la que se buscará determinar ante *S. mutans* y *P. gingivalis*.

Por ello, este trabajo es posible porque se cuenta con las unidades de estudio, literatura científica y conocimiento metodológico para su desarrollo, el cual se realizará siguiendo las normas respectivas evitando cualquier tipo de sesgo en los resultados. (Anexo 01)

El proyecto es de interés porque podremos determinar cuál es la actividad antibacteriana del enjuague a base de propóleo y comparar su efectividad con la Clorhexidina al 0.12%, ante estas dos principales cepas bacterianas causantes del avance de la caries dental y enfermedad gingivoperiodontal, como son el *S. mutans* y *P. gingivalis*.

El conocimiento de estos datos será novedoso pues podrá ampliar la información existente, sobre la efectividad que tendría el uso del enjuague bucal elaborado a base de propóleo como una eventual alternativa complementaria o coadyuvante para la prevención y tratamiento en el cuidado de la salud dental.

Además, será relevante porque motivará a la realización de otros proyectos enfocados no solo en el uso del propóleo, sino demás biomateriales naturales

que puedan ser efectivos ante otras cepas bacterianas y que mantengan el equilibrio del medio bucal o sean útiles ante otros tratamientos dentales.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes de la investigación

Antecedentes Internacionales

Jafarzadeh Kashi TS et al. “Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms”; Iran:2011

Evaluaron la capacidad antibacteriana de los extractos etanólicos y agua del propóleo iraní contra el *Streptococcus mutans* ATCC 35668; *Streptococcus salivarius* ATCC 9222; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Enterococcus faecalis* ATCC 9854 y *Lactobacillus casei* ATCC 39392. Utilizaron el método de difusión en agar para determinar la actividad antibacteriana del propóleo a diferentes concentraciones y establecieron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). En los resultados el extracto etanólico de propóleo mostró actividad bacteriostática y bactericida contra todas las cepas en rangos de CMI y CMB de 250-500 µg / ml, mientras la CMI del extracto de agua del propóleo iraní fue de 500 µg / ml mostrando solo actividad bactericida contra el *S. mutans* (20mg/ml). Concluyeron que el extracto etanólico es más útil en el control de biopelículas orales y del desarrollo de la caries. (10)

Dziedzic A et al. “The Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Polish Propolis on Mutans Streptococci and Lactobacilli Isolated from Saliva”; Poland:2013

Determinaron in vitro las propiedades antibacterianas del extracto de etanol de propóleo (EEP) recolectado en Polonia, contra las principales bacterias cariogénicas: *Streptococcus mutans* y *Lactobacilos*.

Utilizaron el método de difusión en caldo y el ensayo Alamar Blue para evaluar la actividad antimicrobiana, establecieron su concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB).

Mediante un análisis bioquímico se evaluó la composición de los componentes del propóleo. Los resultados mostraron que la exposición de

microorganismos al propóleo (0,025–24mg/ml) durante 24h afectó la viabilidad de las bacterias demostrando su actividad antimicrobiana in vitro. Concluyendo así que el efecto antibacteriano del propóleo parece ser una representación de la actividad sinérgica de los polifenólicos y otros ingredientes orgánicos. (11)

A. Eralp Akca et al. “The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An in Vitro Study”; Istanbul:2016

Compararon la efectividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo con el gluconato de Clorhexidina empleando cepas como el *Streptococcus mutans* planctónico, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii*, y *Candida albicans*, Utilizaron la dilución en agar y métodos de prueba de micro dilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria, bactericida y fungicida de ambos agentes antimicrobianos. La Clorhexidina exhibió concentraciones mínimas bactericidas más bajas a diferencia del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *A. actinomycetemcomitans*, *S. aureus* y *E. faecalis*, mientras que EEP arrojó un mejor resultado contra *Lactobacillus* y *P. intermedia*. Las concentraciones bactericidas y fungicidas de ambos agentes eran iguales contra las biopelículas de *Streptococci*, *P. gingivalis*, *A. israelii* y *C. albicans*. Ambos agentes inhibieron el crecimiento de todas las especies planctónicas. Concluyeron que el EEP en concentraciones apropiadas puede servir para elaborar un enjuague antimicrobiano natural para evitar los efectos secundarios de la Clorhexidina. (12)

Rahman Nazeri. Ghaiour M, Abbasi S. “Evaluation of Antibacterial Effect of Propolis and its Application in Mouthwash Production”; Tehran:2019

Determinaron las propiedades antibacteriales del propóleo, asimismo evaluaron su uso como un enjuague bucal. Primero prepararon el extracto alcohólico de propóleo, del cual hallaron su concentración mínima inhibitoria (CMI) usando el método de dilución en agar, ante *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Enterococcus faecalis*. Obtenida la CMI, los resultados mostraron que esta fue baja para *S. aureus* y más alta para *L. acidophilus*. Luego produjeron el enjuague bucal para comparar su efectividad con agua, Clorhexidina y Listerine, usando ratas de laboratorio de donde recogieron muestras salivales a las 12 horas, a la 1 semana y 2 semanas después del uso del colutorio. Estas muestras se examinaron por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) y los datos obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y medidas repetidas ANOVA ($\alpha = 0.05$). Los hallazgos de RT-PCR indicaron que el agua no tuvo ningún efecto sobre el nivel de bacterias orales, mientras que el enjuague de propóleo mostró una diferencia significativa en comparación con la Clorhexidina y Listerine ($P < 0.05$) en términos del número de colonias de *S. mutans*, *E. faecalis* y *L. acidophilus*, mientras que estos dos últimos fueron menos eficientes. Entre la Clorhexidina y el enjuague de propóleo hubo diferencias significativas ($P = 0.110$) con respecto a las colonias de *S. aureus*, por otro lado, el Listerine tuvo una eficacia menor que cualquiera ($P < 0.05$). Se concluyó que el enjuague a base de propóleo fue más eficiente que la Clorhexidina frente *E. faecalis*, *L. acidophilus*, y *S. mutans* y mostro resultados similares ante *S. aureus* (13).

Antecedentes Nacionales

Díaz-Suyo JA, Proaño-de Casalino D. “Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*” :2011

Compararon el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo utilizando diferentes concentraciones de 1%, 5% y 10%. Se eligieron dos cepas bacterianas involucradas en la periodontitis crónica. En el estudio se utilizó el método de difusión en agar y para comparar los datos de los extractos etanólicos con el gluconato de Clorhexidina al 0.2%, se usó la

prueba t para muestras independientes con las cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*, a excepción del extracto al 5% ante esta última cepa, que fue analizado con la prueba U de Mann Whitney. Los resultados indicaron que los halos de inhibición de los extractos etanólicos fueron mayores ante *P. gingivalis* cuando se comparó con la bacteria de *F. nucleatum*. Además, el extracto al 10% presentó una actividad antibacteriana mayor a la Clorhexidina sobre la cepa de *P. gingivalis*. Concluyendo que el extracto etanólico de propóleo al 10% tiene mayor efectividad antibacteriana sobre ambas cepas periodontopatógenas (14).

Ayala Jara CI, Castillo Saavedra EF, Graus Mejía L, Casanova Luján J, Seclén Ayala LE. “Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana”; Perú:2016

Desarrollaron un enjuague bucal con extracto de propóleo para evaluar in vitro la actividad antibacteriana ante cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Emplearon el método de difusión en agar para la evaluación del efecto antibacteriano donde los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza, prueba de Kruskal Wallis y la prueba de Duncan para un nivel de significancia de 5%. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto fueron hechas mediante pruebas de sensibilidad a distintas concentraciones. Resultando la concentración mínima bactericida del propóleo en 1,5ug/ml; estos datos demostraron que el halo de inhibición para el enjuague bucal a base de propóleo es mayor en relación a las diluciones 1:2 y 1:4, siendo la formación de halos superior a 7.93 mm de tal forma que estadísticamente presento una diferencia significativa ($p < 0,05$). Concluyeron que el enjuague bucal a base de propóleo, tiene calidad farmacéutica y efecto antibacteriano ante cepas de *S. mutans*. (15)

2.2 Marco Teórico

2.2.1. Propóleo

Propóleo del genitivo “propolis”, es una sustancia oscura y viscosa de consistencia resinosa, con la que las abejas protegen la parte interna de la colmena utilizándolo para tapar grietas y orificios; así también para aislar el interior de las condiciones atmosféricas, agentes extraños e infecciosos (16). Este tiene capacidad biocida, la cual le permite matar bacterias invasoras, hongos e incluso larvas, es importante destacar que no todas las especies de abejas producen el mismo grado o tipo de propóleo, las colonias de *Apis dorsata*, denominadas también como abejas melíferas gigantes, usan el propóleo para fortalecer la adhesión de la colmena, mientras que el tipo de *Apis cerana* no lo usa en absoluto y el *Api mellifera* lo utiliza de todas las formas posibles(7).

Las características del propóleo como el olor y color, dependen de su origen, este último puede ser desde marrón oscuro hasta un tinte verdoso o marrón rojizo, de igual manera su composición química también varía según el continente, región y especie de planta usada para su producción, pese a esto, el propóleo tiene actividades similares como un agente antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiparasitario, antiinflamatorio, antiproliferativo y antioxidante(5)(17).

2.2.1.1 Composición química del propóleo

La composición química del propóleo es variable principalmente en las regiones tropicales, debido al origen diferente de las plantas, donde influye el paradero climático, geográfico, la flora en el lugar de recolección y las especies de abejas; estas últimas usan secreciones de diferentes plantas, como materiales lipofílicos en las hojas, yemas, resinas y matrices.

Dentro de los componentes químicos posee flavonoides sin sustituyentes como la crisina, galangina y pinocembrina, también éster de fenetilo del ácido cafeico (CAPE) que es el componente principal del propóleo que se halla en climas templados. En las regiones tropicales este incluirá fenilpropanoides como la artepilina C, mientras que en las regiones del Pacífico y África contiene geranil flavonoide como un compuesto característico (18). Los polifenoles y terpenoides también se consideran componentes activos, así como los ácidos aromáticos siendo los más frecuentes el ácido ferúlico, cinámico, caféico, benzoico, salicílico y p-cumárico(17).

El propóleo crudo generalmente está compuesto por 50% de resina y bálsamo vegetal, 35% de ceras (principalmente cera de abejas, algunas ceras vegetales), 5% a 10% de aceites aromáticos, 5% de polen y otras sustancias menores, así como algunos elementos esenciales como el magnesio, calcio, hierro, níquel, zinc y también vitaminas B1, B2, B6, C y E (19). Esta variedad en su composición química le da una ventaja como agente antibacteriano, ya que la combinación de sus compuestos activos y presencia en diversas proporciones evita la aparición de la resistencia bacteriana.

2.2.1.2 Propiedad antibacteriana del propóleo

El efecto antibacteriano del propóleo es primordialmente debido a la presencia de fenoles y flavonoides como la galangina, pinocembrina, derivados de los ácidos benzoicos, ferúlico y cafeico (18). Este efecto actúa sobre microorganismos gram positivos como el estafilococo dorado y estreptococo beta hemolítico; y algunos gram negativos como Piciánico y Proteus(20). Los flavonoides tienen un efecto inmunoestimulante, que neutraliza el efecto de la diseminación de las toxinas, además destruyen las células bacterianas y micóticas.; asimismo se encargan de que el tejido conectivo débil se

fortalezca para evitar que los agentes infecciosos se difundan, favoreciendo la inmovilización y encapsulación de los mismos, lo que causa la descomposición gradual(21). Su eficacia antibacteriana afecta también la membrana citoplasmática e inhibe la movilidad y actividad enzimática de las bacterias, que son propiedades particulares de cada una; logrando tener efecto sobre el crecimiento y/o la viabilidad del patógeno(22).

2.2.1.3 Aplicaciones del propóleo en la Odontología

El propóleo está determinado como un agente eficiente para múltiples finalidades, desde su aplicación para la curación quirúrgica de heridas, como solución para la irrigación intra conducto, enjuagues bucales(10) o geles para la cicatrización en procedimientos quirúrgicos periodontales, prevención de caries e inclusive teniendo efectos favorables en el tratamiento de la estomatitis aftosa (9).

Hwu Yueh-Juen, en su estudio busco evaluar la eficacia del propóleo en la salud bucal, determinando que la efectividad del enjuague bucal de propóleo puede llegar a compararse con otros enjuagues como la Clorhexidina o hexitidina; también sugirió que más estudios son necesarios para reafirmar la superioridad o igualdad del propóleo ante otros productos convencionales para reducir la infección oral, placa y estomatitis (8). Además, por su buena actividad antimicrobiana se indica que el uso del propóleo en enjuagues puede disminuir la formación de placa, atenuar el dolor dental, la periodontitis y aminorar la presencia bacterias en la boca (23). Carvalho, demostró igualmente un uso prometedor especialmente en la cariología y periodoncia, fomentando la incorporación de este agente natural, basados en el conocimiento y manejo de sus propiedades terapéuticas y composición (24).

El propóleo es usado también como un antiviral y antifúngico, ya que pospone en una etapa temprana del herpes simple el crecimiento y progresión de los cambios cutáneos; de la misma manera puede ser usado como enjuague o gel en la aplicación local en pacientes con candidiasis oral que emplean prótesis removibles (25).

2.2.2 Actividad bacteriana de la cavidad bucal

La cavidad bucal posee una cantidad extensa de especies microbianas; donde la colonización de los microorganismos inicia antes de la erupción de cualquier pieza dentaria; y ya con la presencia de estas, la placa dental comienza a formarse en las superficies expuestas, que están cubiertas a su vez por una película conformada principalmente por glicoproteínas salivales (26). El crecimiento de la actividad bacteriana es estimulado en gran parte por el consumo de carbohidratos fermentables como la sacarosa, esto se debe a que la ausencia de oxígeno, el metabolismo fermentativo y el crecimiento de la misma conlleva a la formación de ácidos orgánicos; y aunque la mayoría de estas cepas bacterianas sean inocuas, bajo ciertas condiciones específicas alteran la normalidad en el medio bucal, provocando afecciones orales como la caries o enfermedad periodontal (27).

2.2.2.1 *Streptococcus mutans*

Es un microorganismo gram positivo que se caracteriza por ser anaerobio facultativo, no móvil y estar dispuesto en cadena, tiene la capacidad de modificar el pH de un medio en un promedio de 24 horas, de un pH 7 a uno de 4.2 a causa de su veloz producción de ácido láctico. El *S. mutans* es un fermentador por excelencia de glucosa, rafinosa, manitol, lactosa, salicina e inulina, y se encuentra subclasificado en base a sus propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas, siendo sus serotipos c, e, f y k (26). Este es considerado además un potente agente cariogénico, ya que sintetiza glucanos; estos se encargan de desdoblar la sacarosa en sus dos componentes; de

glucosa, que se encargará de formar una valla de glucano, y la fructosa, que será utilizada como un sustrato para el crecimiento de la bacteria.

Estos en conjunto con residuos orgánicos y otras bacterias en el medio formarán la placa dental y si la acidez producida por las fluctuaciones del pH persiste afectará la superficie del esmalte(28).

2.2.2.2 *Porphyromonas gingivalis*

Es un cocobacilo gram negativo, cuya nutrición necesita de péptidos pequeños y aminoácidos, se caracteriza por poseer fimbrias y no ser esporulado. Su diversidad genética le permite intercambiar ADN cromosómico entre otras cepas y de esta manera genera cambios fenotípicos sobre la cantidad de fimbrias y procesos de agregación, favoreciendo su patogenicidad. La *P. gingivalis* en su membrana externa posee lipopolisacáridos endotóxicos que tienen un factor virulento, induciendo la destrucción y alteración del tejido periodontal(29).

Su patogenicidad en general se debe a los factores de virulencia ya que estos facilitan su permanencia y crecimiento, así como la saliva que influye también en su colonización, y actúa como un vector para su difusión y colonización inicial en el medio bucal (30).

CAPITULO III

HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES

3.1 Hipótesis

H0: El enjuague bucal a base de propóleo presenta menor actividad antibacteriana que la Clorhexidina al 0.12% ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

H1: El enjuague bucal a base de propóleo presenta mayor actividad antibacteriana que la Clorhexidina al 0.12% ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

3.2 Operacionalización de las variables

Variable	Indicador	Valor final	Escala
Enjuague bucal	Tipo de enjuague	-Enjuague a base de extracto etanólico de propóleo. -Clorhexidina al 0.12%	Categórica nominal
Cepa bacteriana	Tipo de cepa bacteriana	- <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 - <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	Categórica nominal
Actividad antibacteriana	Halos de inhibición	-Resistente (-): ≤ 9 mm -Límite intermedio (sensible +): 9 a 14mm -Sensibilidad media (muy sensible ++): >15-19mm -Sumamente sensible (+++): ≥ 20 mm	Intervalo
	CMI CMB	mg/ ml UFC	Razón/ ordinal

CAPITULO IV

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Diseño de la Investigación

4.1.1 Diseño

Esta investigación es de tipo Experimental. Se manipuló el extracto etanólico de propóleo para elaborar con este un enjuague bucal donde se determinó su actividad antibacteriana ante las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277.

4.1.2 Tipo de investigación

El tipo de investigación fue:

- ✂ **Analítica:** Se determinó la actividad antibacteriana, CMI y CMB del extracto etanólico de propóleo, así como el efecto antibacteriano del enjuague a base de extracto etanólico de propóleo ante *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 comparándolo con la Clorhexidina al 0.12%
- ✂ **Experimental:** Existió la intervención del investigador sobre las variables analíticas y se demostró la actividad antibacteriana in vitro.
- ✂ **Prospectiva:** Los datos fueron recopilados y obtenidos de primera fuente.
- ✂ **Transversal:** Se comparó la actividad antibacteriana del enjuague a base de extracto etanólico de propóleo con la Clorhexidina de 0.12% en un tiempo determinado.

4.1.3 Ámbito de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio del Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, con la supervisión respectiva en cada área de trabajo. (Anexo 02)

4.1.4 Muestra y Unidad de Estudio

El cálculo de las repeticiones para el ensayo microbiológico se determinó usando los datos de un estudio previo (10), donde el tamaño de la media se determinó utilizando la ecuación basada en la potencia (β) y confianza (α).

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma_{\delta}^2}{\delta^2}$$

Donde:

$Z_{\alpha/2}$ = Confianza al 95% (1.96)

Z_{β} = Potencia de la prueba al 80% (0.84)

$\sigma_{\delta}^2 / \delta^2 = 1$ = Variación realtiva de los halos 1

n= Mínimo 8 repeticiones para los enfrentamientos bacterianos.

Unidad de análisis: Placas Petri con cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 en las que se aplicó el enjuague bucal a base de extracto etanólico de propóleo.

4.1.4.1 Criterios de inclusión

- Discos de sensibilidad desnaturalizados.
- Placas petri correctamente inoculadas con cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277.

4.1.4.2 Criterios de exclusión

- Discos de sensibilidad que se hayan contaminado durante o después del procedimiento de desnaturalización.
- Placas petri contaminadas antes o durante la inoculación.

4.1.5 Materiales de laboratorio

4.1.5.1 Equipos

- Balanza analítica KERN AES
- Agitador Vortex analógico
- Incubadora
- Autoclave vertical cilíndrica

- Estufa de secado

4.1.5.2 Materiales de vidrio

- Placas petri de vidrio ANUMBRA de 100mm x 15mm
- Embudo
- Vaso Beaker
- Probeta DURAN de 250ml
- Probeta DURAN de 5ml
- Frascos viales
- Matraz de fondo redondo DURAN 500ml
- Matraz de fondo plano DURAN 250ml
- Matraz de fondo redondo DURAN 100ml
- Tubos de ensayo
- Jarras Petri de anaerobiosis
- Asa Digralsky
- Pipeta graduada de 20ml
- Frascos ámbar

4.1.5.3 Medios de cultivo, bacterias y reactivos

- Agar nutritivo Himedia
- Agar Mueller Hinton II Liofilchem
- Infusión cerebro corazón Liofilchem
- Agar cerebro corazón Liofilchem
- Discos de sensibilidad de Ceftriaxona OXOID
- Sobres GasPack
- Agua destilada estéril
- Alcohol Alkofarma al 70°
- Bacteria de *Streptococcus mutans* ATCC 215175
- Bacteria de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

4.1.5.4 Otros

- Micropipeta Transferpette de Brand 100 -1000 µl
- Micropipeta Transferpette de Brand 0.5 -10 µl
- Pipeta Pump 10ml
- Papel filtro Albel y Wathman
- Bisturí N° 3

- Hoja de bisturí N°15
- Jeringa descartable de 5ml
- Glicerina vegetal 99.5% 1kg
- Sorbitol 70% FOOD GRADE – ROQUETTE
- Alkupon (Texapon 70%) OXITENO
- Gradilla
- Asa bacteriológica de Kolle
- Compas Vernier TRUPER
- Pinza recta
- Mechero
- Papel Kraft para esterilizar
- Algodón Coppon
- Papel de aluminio
- Ron de quemar
- Papel toalla
- Guantes
- Guardapolvo

4.1.6 Instrumento de recolección de datos

Se elaboraron 7 fichas como base datos con sus respectivas tablas, en las que se adjuntaron los resultados obtenidos en cada fase de la investigación para demostrar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo, su concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y actividad antibacteriana del enjuague bucal a base del extracto etanólico de propóleo. (Anexo 03)

CAPÍTULO V

PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS

5.1 Procedimientos y métodos

5.1.1. Obtención del propóleo

Se adquirió de la empresa de productos apícolas Hierbamiel Perú S.A.C. 250g de propóleo en estado natural procedentes de la ciudad de Oxapampa, Pasco, Perú. Para evitar su contaminación se trasladó en un frasco de vidrio estéril envuelto en papel Kraft, el cual se reservó en el Área de Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann para la preparación del extracto, elaboración del enjuague y posterior evaluación de su sensibilidad bacteriana.

5.1.2. Preparación del extracto etanólico de propóleo

El extracto etanólico de propóleo fue preparado usando el método de maceración. Una vez recolectado los 250g, se separaron las impurezas (pedazos de hojas, troncos, etc.) y se pesó nuevamente, quedando un total de 229.9g. Esta cantidad se trozó para después pulverizarla con ayuda de una procesadora, resultando así en 135.7g de propóleo en partículas pequeñas. Estas se colocaron en un envase de vidrio color ámbar previamente esterilizado, al que se le agregó 360 mL de alcohol al 70% de tal forma que el solvente cubrió todos los fragmentos. Se dejó macerar por 20 días a temperatura ambiente, protegido de cualquier fuente de luz y con agitación diaria. Pasado este lapso, se procedió a filtrar varias veces en un matraz de fondo redondo y probeta, usando papel filtro sin cenizas Albet[®] N° 40, doble papel filtro Wathman[®] N° 42, y para realizar un último filtrado papel filtro Wathman[®] N° 1. Luego los 266 mL filtrados de extracto etanólico se vertieron sobre una placa petri de vidrio y se llevó a una estufa a 38°C por 24 horas con el propósito de evaporar el alcohol restante (31).

5.1.3. Obtención de las concentraciones de extracto etanólico de propóleo

La placa petri con el extracto etanólico de propóleo se retiró de la estufa, y una vez enfriado, usando un bisturí N°3 con hoja N°15 se retiró unos pequeños pedazos de propóleo, a los que se les agregó 3 mL de agua destilada estéril y se comenzó a homogenizar con un agitador tipo vórtex, hasta que quedó lo más disuelto posible. Para conocer la concentración del extracto etanólico de propóleo (EEP) se aplicó la regla de la densidad, pesando de la cantidad disuelta 1mL dentro de una probeta sobre la balanza analítica; resultando que, en 1 mL se tiene 1044mg de EEP. Se trabajó con 6 volúmenes de 17.5 µl a 30 µl, para los que se estableció sus concentraciones de la siguiente manera (Tabla N° 1):

$$\begin{array}{l} 1\text{ml} \text{ ----- } 1044\text{mg} \\ 0.0175 \text{ ml} \text{ ----- } x \\ 1 \text{ ml} (x) = 0.0175 \text{ ml} (1044\text{mg}) \\ x = 18.27 \text{ mg/ ml} \end{array}$$

Tabla 1. Concentraciones del extracto etanólico de propóleo en los discos ante las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277.

Extracto etanólico de propóleo	
Volumen (µl)	Concentración (mg/ ml)
17.5	18.27
20.0	20.88
22.5	23.49
25	26.1
27.5	28.71
30.0	31.32

Fuente: Elaboración propia

5.1.4 Caracterización físico-química

Se estableció la caracterización físico químico del extracto etanólico de propóleo por medio de una marcha fitoquímica con la técnica de reacciones de coloración a la gota, seguido de un análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), determinando así sus características cualitativas y cuantitativas.(32)

Condiciones de Análisis por HPLC	
Cromatógrafo:	Agilent series 1200
Software:	Chemstation V03.02
Columna:	Zorbax Eclipse XDB C18 4.6d x 250mm, 5um
Pre Columna:	Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5um
Flujo:	0.800 ml/min.
Solvente A:	95.0 % H ₃ PO ₄ 0.1%
Solvente B:	5.0 % MeCN
Sistema de Análisis:	De 0 a 2 min 5.0% B, a 6 min 10% B, a 60 min 50% B, 65 min 50% B.
Detección DAD:	285 nm
Temperatura del Horno:	40.0°C
Tiempo de Análisis:	65 min.
Volumen de Inyección:	1.0 µl

Fuente: Laboratorio de cromatografía y espectrometría de la Universidad Nacional de San Antonio Abad.

5.1.5 Obtención de las cepas

Las cepas bacterianas liofilizadas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 correspondientes al ATCC (American Type Culture Collection) fueron adquiridas a través de la empresa de biotecnología GenLab S.A.C.

5.1.6 Preparación de los medios de cultivo

El medio de cultivo preparado para la activación de *S. mutans* ATCC 25175 fue el agar BHI (Brain Heart Agar) y para *P. Gingivalis* ATCC 33277 Agar sangre. Para continuar estimulando su crecimiento, dado que las bacterias liofilizadas se encuentran altamente estresadas, se preparó tubos de ensayo con caldo BHI (Brain Heart Infusion) y viales con agar nutritivo (altamente enriquecido), los que fueron esterilizados en autoclave a una presión de 15 libras (121 °C) por 15 minutos. El sembrado de las cepas para la determinación antibacteriana se realizó en Agar Mueller Hinton.

Los medios de cultivo fueron preparados según las instrucciones del fabricante (Tabla N°2).

Tabla 2. Norma para la preparación de los medios de cultivo.

Medio de cultivo	Norma para la preparación
Agar Mueller Hinton	38g por cada 1000ml
Agar BHI	52g por cada 1000ml
Agar Sangre	40g por cada 1000ml
Agar Nutritivo	28g por cada 1000ml
Caldo BHI	37g por cada 1000ml

Fuente: Elaboración propia

5.1.7 Activación de las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Para la activación se sembró el inóculo liofilizado de *S. mutans* ATCC 25175 en una placa petri con Agar BHI (Brain Heart Agar) y la *P. gingivalis* ATCC 33277 en una placa con Agar sangre. Se usó el método del estriado, distribuyéndose en un solo plano. Se colocaron las placas en una jarra de anaerobiosis cada una, junto con un sobre Gaspak que comenzó a liberar CO₂, eliminando así el oxígeno restante y generando las condiciones adecuadas para su desarrollo. Se incubó por un período de 48 horas la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 y la de *P. gingivalis* ATCC 33277 por 168 horas, ambas a 37°C.

Luego se tomó 1 a 2 colonias de la placa con un asa bacteriológica y se llevó a un tubo de ensayo con caldo BHI (Brain Heart Infusion) para continuar estimulando su crecimiento; este se incubó por 24 horas más por anaerobiosis, para después ser llevado por agotamiento a dos viales con Agar nutritivo, uno que se utilizó como bacteria madre para su mantención y otro como repique.

Reactivadas, la estandarización de las cepas se realizó según la escala de 0.5 de Mc Farland, para ello se diluyó el inóculo por suspensión en un tubo de ensayo con caldo BHI (Brain Heart Infusion) y se llevó a la incubadora por 2 horas hasta conseguir la misma turbidez del patrón de la escala.

5.1.8 Sensibilidad bacteriana (método de Kirby Bauer) al extracto etanólico de propóleo ante las cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

-Preparación de la solución de extracto etanólico de propóleo

Se preparó 2280 µl de extracto etanólico de propóleo para la determinación de la sensibilidad bacteriana ante ambas cepas, tomando en cuenta que se trabajó con 6 volúmenes de 17.5µl a 30µl, cada uno con 8 repeticiones.

-Preparación de los discos

Se utilizó discos de sensibilidad de ceftriaxona de 6 mm de diámetro, que se desnaturalizaron, llevándolos en un vaso Beaker de vidrio (400ml) con agua destilada a la autoclave por 15 minutos. Después se retiró el agua y se acomodó los discos en las paredes del vaso, para llevarlo a la estufa a 170 °C por 1 hora. Con una pinza adson se distribuyó los discos en placas petri estériles, previamente marcadas con los volúmenes del extracto etanólico de propóleo y sus controles negativos (dH₂O) y positivos (clorhexidina 0,12%). Se agregó la cantidad determinada de extracto etanólico de propóleo a cada disco, con una micropipeta de 100µl y se dejó reposar por 5 minutos.

Se utilizaron 6 concentraciones con 8 repeticiones ante las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277, habiendo usado un total de 100 discos.

-Inoculación de las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 en placas petri

Luego de la activación de las cepas en caldo BHI (Brain Heart Infusion) y su estandarización a la escala 0.5 de Mc Farland, se procedió a inocular las placas de Agar Mueller Hinton trasladando 100µl de la suspensión bacteriana con una micropipeta y se diseminó con una espátula Digrafsky. Se dejó reposar unos minutos a temperatura ambiente. Se inoculó 12 placas petri para cada cepa.

-Distribución de los discos con diferentes volúmenes de extracto etanólico de propóleo

Los discos previamente embebidos con los volúmenes de extracto etanólico de propóleo desde 17.5µl a 30µl, se distribuyeron en las placas aplicando una ligera presión. Se colocaron 4 discos en cada placa, teniendo en cuenta el número de repeticiones por volumen.

-Incubación

Las placas petri se colocaron en una jarra de anaerobiosis con un sobre Gaspak y fueron incubadas por 24 horas a 37°C.

-Lectura de los halos de inhibición

Se realizó con ayuda de un calibrador vernier, donde se midió los halos de inhibición en tres sentidos. Se usó la escala de DURAFFOURD y LAPRAZ que considera el efecto antibacteriano como(33):

Resistente (-)	≤ 9 mm
Límite Intermedio (Sensible=+)	9 a 14 mm
Sensibilidad media (muy sensible = ++)	>15 a 19 mm
Sumamente sensible (S.S.= +++)	≥ 20 mm.

5.1.9 Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó usando el método de macro dilución en caldo. Se tuvo como referencia para las diluciones aquellas concentraciones en las que la bacteria presentó sensibilidad al extracto. Se realizaron 10 diluciones.

Se determinó el valor de las diluciones teniendo en cuenta las concentraciones con sensibilidad al extracto, que fueron entre 28.71mg/ml y 31.32mg/ml.

Donde la diferencia de ambas, dividida por la cantidad total de diluciones por realizar nos da el valor del aumento progresivo de cada dilución (Esquema N°1).

$$\text{Concentraciones: } 28.71 - 31.32 = 2.61$$

$$2.61 / 10 = 0.261$$

Esquema 1. Concentración final (mg/ml), del aumento progresivo de las diluciones.

	0.261	0.261							
	↖	↖	↖	↖	↖	↖	↖	↖	↖
28.71	28.971	29.232	29.493	29.754	30.015	30.276	30.537	30.798	
mg/ml	mg/ml								
↖									
31.059	31.32								
mg/ml	mg/ml								

Fuente: Elaboración propia

-Preparación de la solución madre

Se preparó en un matraz de fondo plano un total de solución madre de 30ml, que contenían 25ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) y 5ml de extracto etanólico de propóleo. Para obtener la concentración total de extracto etanólico de propóleo que se estaba llevando en la solución madre (SM) se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$1044\text{mg (1ml)} = C_2 \cdot 30\text{ml}$$

$$C_2 = 34.8\text{mg}$$

Donde:

C₁: Concentración de EEP en 1ml

V₁: Volumen de agua destilada

C₂: Concentración total de EEP en la SM

V₂: Volumen total de la SM

$$30\text{ml} = 30\,000\mu\text{l}$$

-Distribución de la solución madre, suspensión bacteriana y BHI en los tubos de ensayo

Para determinar el volumen de solución madre que se llevó a cada tubo de ensayo, se halló en primer lugar la concentración inicial (mg/ml), multiplicando la cantidad total del volumen de cada tubo, que fue de 3ml (equivalente a 3000µl) por cada concentración final (mg/ml) del aumento progresivo de las diluciones, de la siguiente manera:

Concentración final (mg/ml) * 3ml = Concentración inicial (mg/ml)		
28.71	* 3ml =	86.13
28.971	*3ml =	86.913
29.232	*3ml =	87.696
29.493	*3ml =	88.479
29.754	*3ml =	89.262
30.015	*3ml =	90.045
30.276	*3ml =	90.828
30.537	*3ml =	91.611
30.798	*3ml =	92.394
31.059	*3ml =	93.177
31.32	*3ml =	93.96

Fuente: Elaboración propia

Luego se aplicó una regla de tres simples teniendo en cuenta que:

$$\begin{array}{r}
 30\ 000 \quad \underline{\hspace{1cm}} \quad 34.8 \\
 \times \quad \underline{\hspace{1cm}} \quad 86.13 \\
 \hline
 x = 74.250
 \end{array}$$

Donde:

Volumen total de la SM = 30 ml = 30 000 µl

Concentración total de EEP en la SM = 34.8mg

Concentración inicial = 86.13 (mg/ml)

X = Volumen de solución madre

Obteniendo de esta manera la cantidad de solución madre que se distribuyó para cada tubo de ensayo. Para determinar la cantidad de caldo BHI (Brain Heart Infusion) se sumó la cantidad de solución madre junto con la cantidad de suspensión bacteriana de 300µl restándole la cantidad total de 3000µl que contiene cada tubo (Tabla N° 3).

Tabla 3. Distribución de la solución madre, suspensión bacteriana y BHI en los tubos de ensayo.

Tubo	Concentración inicial (mg/ ml)	Concentración final (mg/ ml)	Solución madre (µl)	Suspensión bacteriana (µl)	BHI (µl)	TOTAL (µl)
T ₁	86.13	28.71	74.25	300	2625.75	3000
T ₂	86.913	28.971	74.925	300	2625.075	3000
T ₃	87.696	29.232	75.600	300	2624.4	3000
T ₄	88.479	29.493	76.275	300	2623.725	3000
T ₅	89.262	29.754	76.950	300	2623.05	3000
T ₆	90.045	30.015	77.625	300	2622.375	3000
T ₇	90.828	30.276	78.300	300	2621.7	3000
T ₈	91.641	30.537	78.975	300	2621.025	3000
T ₉	92.394	30.798	79.650	300	2620.35	3000
T ₁₀	93.177	31.059	80.325	300	2619.675	3000
T ₁₁	93.96	31.32	81	300	2619	3000
T ₁₂	c+			300	2700	3000
T ₁₃	c-			—	3000	3000

Fuente: Elaboración propia

-Incubación

Se utilizaron un total de 13 tubos de ensayo para cada cepa bacteriana, incluyendo sus controles positivos (suspensión bacteriana) y negativos (caldo BHI). Los 26 tubos se llevaron en una jarra de anaerobiosis a la incubadora por 24 horas a 37 °C.

-Lectura

Se realizó pasada las 24 horas y se seleccionó aquellos tubos de ensayo en los que ya no se observaba turbidez, siendo esto indicador de ausencia de crecimiento bacteriano.

5.1.10 Determinación de la Concentración mínima bactericida (CMB)

Para la determinación de la CMB se utilizó aquellos tubos de ensayo en los que no se observó crecimiento bacteriano de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277, llevando 100µl de la solución e inoculándolos por diseminación en Agar Mueller Hinton. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas. Pasado este lapso se contó y determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

5.1.11 Elaboración del enjuague bucal a base de propóleo

Se elaboró un enjuague bucal a base de extracto etanólico de propóleo con una concentración específica del extracto y uno sin el (control negativo) usando como base la formulación realizada en el trabajo de Becerra y Layla (34). Los excipientes seleccionados son de uso generalizado para este tipo de forma farmacéutica y las concentraciones con las que se trabajaron se encuentran dentro de los rangos dados por Muñoz (2000).

FÓRMULA GUÍA PARA LA ELABORACIÓN DEL ENJUAGUE BUCAL (Enjuague Bucal de 80ml)	
SUSTANCIA	CANTIDAD
Lauril éter sulfato de sodio	3 g
Glicerina	14.7 g
Sorbitol	4.5 g
Alcohol al 96%	5 ml
Agua destilada c.s.p.	60 ml

La cantidad utilizada de cada excipiente se modificó teniendo en cuenta el volumen total del enjuague, que fue de 10ml y se optó por no utilizar el alcohol al 96%, con el fin de que no ejerza algún tipo de acción sinérgica en el propóleo o nos dé un resultado sesgado de la actividad antibacteriana.

▪ **Preparación del enjuague**

Una vez pesados los excipientes, se mezcló el Lauril éter sulfato de sodio junto con la glicerina y sorbitol a 800 rpm en un agitador Vortex durante 10 minutos, luego se le agregó el extracto etanólico de propóleo, y por último el agua destilada hasta lograr el volumen propuesto. Se envasó en un frasco color ámbar a causa de la foto sensibilidad del propóleo y se dejó reposar por 24 horas para que se disipe la espuma formada durante la preparación. El volumen de extracto etanólico de propóleo utilizado fue de 292.5 µl, el cual se determinó con la siguiente fórmula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$1044 (V_1) = 30.537 (10ml)$$

$$V_1 = 0.2925ml$$

$$V_1 = 292.5\mu l$$

Donde:

C₁: Concentración de extracto etanólico de propóleo en 1ml

V₁: Volumen de extracto etanólico de propóleo para 10ml de enjuague

C₂: Concentración mínima bactericida del extracto etanólico de propóleo

V₂: Volumen del enjuague bucal

Composición del enjuague de 10ml:

SUSTANCIA	CANTIDAD
Lauril éter sulfato de sodio	0.3 g
Glicerina	1.47 g
Sorbitol	0.45 g
Extracto etanólico de propóleo	292.5 µl
Agua destilada c.s.p.	8.125 µl

Fórmula del enjuague a base de extracto etanólico de propóleo.

SUSTANCIA	CANTIDAD
Lauril éter sulfato de sodio	0.3 g
Glicerina	1.47 g
Sorbitol	0.45 g
Agua destilada c.s.p.	8.125 µl

Fórmula del enjuague sin extracto (control negativo).

5.1.12 Sensibilidad bacteriana (método de Kirby Bauer) al enjuague bucal a base de extracto etanólico de propóleo ante las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 en comparación con la Clorhexidina al 0.12%

Al igual que para determinar la sensibilidad bacteriana al extracto etanólico de propóleo, se empleó el método de Kirby Bauer, usando como medio de cultivo para la inoculación de las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 Agar Mueller Hinton. Se realizaron 8 repeticiones para cada cepa con el enjuague a base de extracto etanólico de propóleo y 2 repeticiones para el enjuague sin extracto (control negativo) y Clorhexidina al 0.12%.

-Preparación de los discos

Se utilizó discos de sensibilidad de 6 mm de diámetro, previamente desnaturalizados. Se distribuyó 8 discos en una placa petri rotulada con los nombres de las bacterias, y con una micropipeta de 100µl se llevó a cada disco 30µl del enjuague a base del extracto etanólico de propóleo, de igual manera se llevó la misma cantidad del enjuague sin extracto a los 4 discos para control negativo y Clorhexidina al 0.12%. Se dejó reposar por 10 minutos de tal manera que los discos quedaron completamente embebidos.

-Inoculación *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 en placas petri

Luego de la activación de las cepas, con un asa bacteriológica se tomó del vial con la bacteria madre, colonias de *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 respectivamente, llevando cada una a un tubo de ensayo con caldo BHI puesto a incubar por 2 horas hasta alcanzar la turbidez de la escala de 0.5 de Mc Farland. Para la inoculación se llevó 100µl de la suspensión bacteriana a las placas petri, diseminándolas con un asa Digrafsky. Luego se dispuso los discos embebidos con el juague, haciendo una ligera presión.

-Incubación

Las placas se colocaron en jarras de anaerobiosis y se llevaron a incubar a 37°C por 24 horas.

-Lectura

Se realizó pasada las 24 horas, donde se midió con un calibrador vernier los halos de inhibición en tres sentidos para determinar su actividad antibacteriana. Para la lectura de los resultados de los halos de inhibición se utilizó la escala de DURAFFOURD y LAPRAZ que considera el efecto antibacteriano de la siguiente manera(33):

Resistente (-)	≤ 9 mm
Límite Intermedio (Sensible=+)	9 a 14 mm
Sensibilidad media (muy sensible = ++)	>14 a 19 mm
Sumamente sensible (S.S.=+++)	≥ 20 mm.

5.2 Análisis de datos

El análisis estadístico fue desarrollado por el SPSS para Windows en su versión 25 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk y de Levene para verificar los supuestos de normalidad de los datos y homocedasticidad. Para la comparación de la susceptibilidad bacteriana de acuerdo a las concentraciones y cepas se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y posterior prueba U-Mann Whitney para los datos de *S. mutans* ATCC 25175 y prueba Ryan Joiner (similar a Shapiro-Wilk) y método Bartlett para los datos de *P. gingivalis* ATCC 33277, posterior prueba Tukey para comparaciones múltiples. El contraste de las hipótesis y la prueba paramétrica de T-Student para analizar la varianza del enjuague bucal a base de extracto etanólico de Propóleo y Clorhexidina al 0.12% ante *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277. Se adoptó un nivel de significancia de $p < 0.05$.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

El análisis químico para el extracto etanólico derivado de propóleo proveniente de Oxapampa, Pasco, Perú detectó la presencia de 46 compuestos fenólicos, de los cuales solo se identificó la presencia de ácido gálico (10.1994µg/ml) y ácido clorogénico (412.8975 µg/ml). (Anexo 04)

SENSIBILIDAD BACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO

Para la sensibilidad bacteriana se procesaron 48 muestras para el extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y 48 muestras para el extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, en diferentes concentraciones: 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml, 26.1 mg/ml, 28.71 mg/ml y 31.32 mg/ml.

Streptococcus mutans

Sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

TABLA 4. Valores descriptivos y prueba para igualdad de medianas

Concentración (mg/ ml)	N	Mediana ± DE	Mínimo	Máximo	Valor p
18.27	8	6.90 ± 1.70 ^a	4.8	9.98	0.000
20.88	8	7.01 ± 0.76 ^a	6.24	8.27	
23.49	8	8.14 ± 0.94 ^a	6.95	9.43	
26.1	8	9.95 ± 0.30 ^b	9.55	10.50	
28.71	8	10.81 ± 3.35 ^c	9.11	16.95	
31.32	8	16.48 ± 3.04 ^d	15.81	24.50	

Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, posterior prueba de U – Mann Witney. Las concentraciones que no comparten una letra son significativamente diferentes.

DE: desviación estándar

Fuente: Elaboración propia

H0: Las medianas son iguales.

H1: Las medianas son diferentes.

De acuerdo a la Tabla 4, se acepta que las medianas presentan diferencias significativas $p < 0.05$, siendo la mediana máxima de 16.48 y la mínima de 6.90.

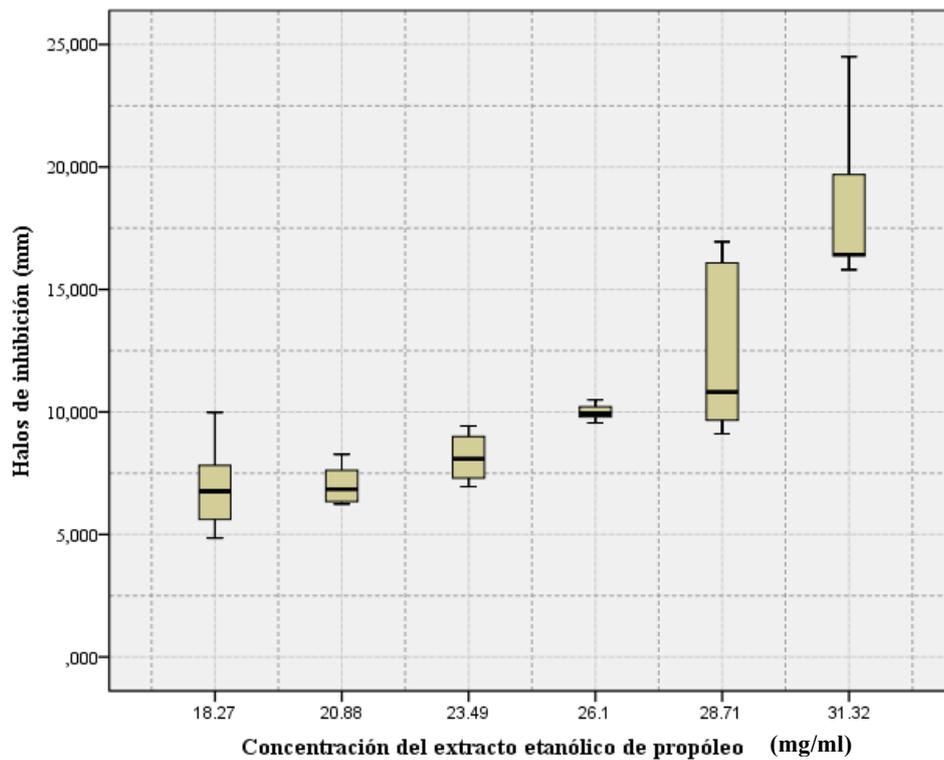


Figura 1. Diagrama de caja del extracto etanólico de Propóleo en diferentes concentraciones: 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml, 26.1 mg/ml, 28.71 mg/ml, 31.32 mg/ml ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

INTERPRETACIÓN

El resumen de estadísticos descriptivos para el extracto etanólico de Propóleo en diferentes concentraciones, para 18.27 mg/ml corresponde un mínimo de 4.8 mm, un máximo de 9.98 mm, con un promedio de 6.90 mm y una desviación estándar de 1.70 mm. Para la concentración 20.88 mg/ml se tiene un mínimo de 6.24 mm, un máximo de 8.27 mm, con un promedio de 7.01 mm y una desviación estándar de 0.76 mm. La concentración 23.49 mg/ml presenta un mínimo de 6.95 mm, un máximo de 9.43 mm, con un promedio de 8.14 mm y una desviación estándar de

0.94 mm. Para la concentración 26.1 mg/ml muestra un mínimo de 9.55 mm, un máximo de 10.50 mm, con un promedio de 9.95 mm y una desviación estándar de 0.30 mm. La concentración 28.71 mg/ml presenta un mínimo de 9.11 mm, un máximo de 16.95 mm, con un promedio de 10.81 mm y una desviación estándar de 3.35 mm. Por último, la concentración 31.32 mg/ml presenta un mínimo de 15.81 mm, un máximo de 24.50 mm, con un promedio de 16.48 mm y una desviación estándar de 3.04 mm.

En la Tabla 4 y Figura 1 se puede observar el comportamiento y la respectiva distribución de datos. En donde las concentraciones de 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml presentan cierta similitud estadísticamente y la concentración de 31.32 mg/ml demuestra mayor diferencia significativa con respecto a la formación del halo de inhibición.

Porphyromonas gingivalis

Sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

TABLA 5. Verificación de normalidad de los datos.

Método	Estadística de prueba	Valor p
Ryan-Joiner	2.91	0.714

Nota: Ryan-Joiner prueba similar a Shapiro – Wilk.

H0: Los datos se distribuyen normalmente.

H1: Los datos no se distribuyen normalmente.

Según el valor de significancia (p=0.714) obtenido en la Tabla 5 se aceptan que los datos se distribuyen normalmente porque el valor P es mayor a 0.05.

TABLA 6. Valores descriptivos y análisis de varianza

Concentración (mg/ ml)	N	Media \pm DE	Mínimo	Máximo	Valor p
18.27	8	11.81 \pm 0.81 ^a	10.38	12.66	0.000
20.88	8	12.43 \pm 0.88 ^a	11.45	13.71	
23.49	8	12.48 \pm 0.58 ^a	11.5	13.32	
26.1	8	13.49 \pm 1.06 ^b	11.85	15.42	
28.71	8	14.44 \pm 0.88 ^b	13.01	15.88	
31.32	8	15.27 \pm 1.00 ^c	13.4	16.9	

Se utilizó el método de Bartlett, posterior prueba Tukey a una confianza del 95%.

Las concentraciones que no comparten una letra son significativamente diferentes.

DE: desviación estándar

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 6, se observa que existen diferencias significativas entre algunas medias de acuerdo a su concentración al ser el valor P menor a 0.05, siendo la media máxima de 15.27 y la mínima de 11.81.

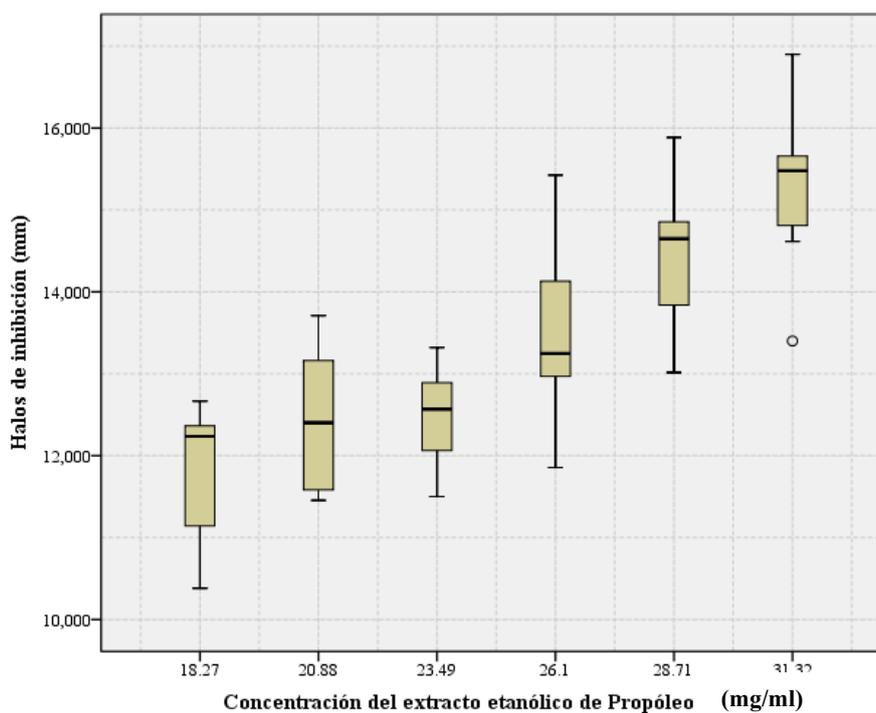


Figura 2. Diagrama de caja del extracto etanólico de Propóleo en diferentes concentraciones: 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml, 26.1 mg/ml, 28.71 mg/ml, 31.32 mg/ml ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

INTERPRETACIÓN

Se observa en la Tabla 6, el resumen de estadísticos descriptivos de los halos de inhibición del extracto etanólico de Propóleo en diferentes concentraciones, para 18.27 mg/ml corresponde un mínimo de 10.38 mm, un máximo de 12.66 mm, con un promedio de 11.81 mm y una desviación estándar de 0.81 mm. Para la concentración 20.88 mg/ml se tiene un mínimo de 11.45 mm, un máximo de 13.71 mm, con un promedio de 12.43 mm y una desviación estándar de 0.88 mm. La concentración 23.49 mg/ml presenta un mínimo de 11.5 mm, un máximo de 13.32 mm, con un promedio de 12.48 mm y una desviación estándar de 0.58 mm. Para la concentración 26.1 mg/ml muestra un mínimo de 11.85 mm, un máximo de 15.42 mm, con un promedio de 13.49 mm y una desviación estándar de 1.06 mm. La concentración 28.71 mg/ml presenta un mínimo de 13.01 mm, un máximo de 15.88 mm, con un promedio de 14.44 mm y una desviación estándar de 0.88 mm. Por último, la concentración 31.32 mg/ml presenta un mínimo de 13.4 mm, un máximo de 16.9 mm, con un promedio de 15.27 mm y una desviación estándar de 1.00 mm.

En la Tabla 6 y Figura 2 se puede observar que las concentraciones de 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml presentan cierta similitud estadísticamente, así como las concentraciones de 26.1 mg/ml y 28.71 mg/ml, demostrando la concentración de 31.32 mg/ml mayor diferencia significativa con respecto a la formación del halo de inhibición.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

TABLA 7. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Tubo	Concentración (mg/ ml)		Solución madre (µl)	Suspensión bacteriana (µl)	BHI (µl)	TOTAL (µl)	Turbidez de CMI
	Inicial	Final					
T ₁	86.13	28.71	74.25	300	2625.75	3000	+
T ₂	86.913	28.971	74.925	300	2625.075	3000	+
T ₃	87.696	29.232	75.600	300	2624.4	3000	+
T ₄	88.479	29.493	76.275	300	2623.725	3000	+
T ₅	89.262	29.754	76.950	300	2623.05	3000	-
T ₆	90.045	30.015	77.625	300	2622.375	3000	-
T ₇	90.828	30.276	78.300	300	2621.7	3000	-
T ₈	91.641	30.537	78.975	300	2621.025	3000	-
T ₉	92.394	30.798	79.650	300	2620.35	3000	-
T ₁₀	93.177	31.059	80.325	300	2619.675	3000	-
T ₁₁	93.96	31.32	81	300	2619	3000	-
T ₁₂		c+		300	2700	3000	+
T ₁₃		c-		_____	3000	3000	-

Positivo (+): Indica crecimiento **c+:** Control positivo (BHI + Bacteria)

Negativo (-): Ausencia de crecimiento **c-:** Control negativo (BHI)

INTERPRETACIÓN:

El tubo de ensayo T₅ resultó negativo a presencia de turbidez, indicando la ausencia de crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a partir de una concentración mínima de 29.754 mg/ml de extracto etanólico de propóleo.

TABLA 8. Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Tubo	Concentración (mg/ ml)		Solución madre (µl)	Suspensión bacteriana (µl)	BHI (µl)	TOTAL (µl)	Turbidez de CMI
	Inicial	Final					
T ₁	86.13	28.71	74.25	300	2625.75	3000	+
T ₂	86.913	28.971	74.925	300	2625.075	3000	+
T ₃	87.696	29.232	75.600	300	2624.4	3000	+
T ₄	88.479	29.493	76.275	300	2623.725	3000	+
T ₅	89.262	29.754	76.950	300	2623.05	3000	+
T ₆	90.045	30.015	77.625	300	2622.375	3000	+
T ₇	90.828	30.276	78.300	300	2621.7	3000	-
T ₈	91.641	30.537	78.975	300	2621.025	3000	-
T ₉	92.394	30.798	79.650	300	2620.35	3000	-
T ₁₀	93.177	31.059	80.325	300	2619.675	3000	-
T ₁₁	93.96	31.32	81	300	2619	3000	-
T ₁₂		c+		300	2700	3000	+
T ₁₃		c-		_____	3000	3000	-

Positivo (+): Indica crecimiento **c+:** Control positivo (BHI + Bacteria)

Negativo (-): Ausencia de crecimiento **c-:** Control negativo (BHI)

INTERPRETACIÓN:

El tubo de ensayo T₇ resultó negativo a presencia de turbidez, indicando la ausencia de crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, a partir de una concentración mínima de 30.276 mg/ml de extracto etanólico de propóleo.

CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

TABLA 9. Resultados de la concentración mínima bactericida (CMB) en diferentes concentraciones ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Tubo	Concentración final (mg/ml)	UFC
T ₅	29.754	Incontable
T ₆	30.015	3
T ₇	30.276	0
T ₈	30.537	0

INTERPRETACIÓN:

De acuerdo a la Tabla 9, la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 corresponde al tubo T₇, cuya concentración es 30.276 mg/ml.

TABLA 10. Resultados de la concentración mínima bactericida (CMB) en diferentes concentraciones ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Tubo	Concentración final (mg/ml)	UFC
T ₇	30.276	Incontable
T ₈	30.537	1
T ₉	30.798	0

INTERPRETACIÓN:

En la Tabla 10 se puede observar que la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Propóleo ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 corresponde al tubo T₈, cuya concentración es 30.537 mg/ml.

SENSIBILIDAD BACTERIANA DEL ENJUAGUE A BASE DE EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO

TABLA 11. Resultados de los halos de inhibición del enjuague bucal a base del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (SM) y ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (PG).

Bacteria	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
SM	8	28,23	1,28	25,91	29,70
PG	8	27,75	0,38	27,13	28,39

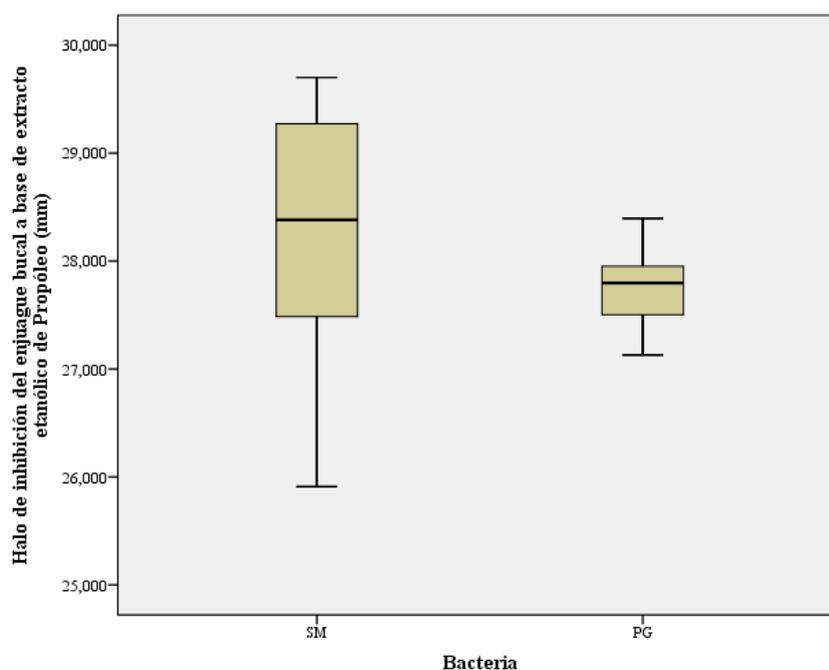


Figura 3. Diagrama de caja del enjuague bucal a base del extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 (SM) y ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (PG).

INTERPRETACIÓN:

Se observa en la Tabla 11 que los halos de inhibición del enjuague bucal a base del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 tiene un mínimo de 25.91 mm, un máximo de 29.7 mm, con un promedio de 28.23 mm y una desviación estándar de 1.28 mm; y los halos de inhibición del enjuague bucal a base del extracto etanólico de propóleo ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 tiene un mínimo de 27.13 mm, un máximo de 28.39 mm y una desviación estándar de 0.38 mm de con un promedio de 27.75 mm.

Se puede observar en la Figura 3, que la distribución de datos del enjuague bucal a base del extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 tiene un comportamiento heterogéneo en comparación a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, que es más homogéneo y uniforme.

CONTRASTE DE HIPÓTESIS

Comprobaremos si los diámetros de los halos de crecimiento (mm) cumplen con el criterio de normalidad basándonos en la prueba de Shapiro-Wilk por medición y grupo de estudio.

TABLA 12. Pruebas de normalidad para las muestras del enjuague bucal a base del extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (SM) y ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (PG).

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
SM	0.937	8	0.584
PG	0.984	8	0.979

H0: Los datos tienen una distribución normal.

H1: Los datos tienen una distribución distinta a la normal.

La Tabla 12 muestra que los valores p o significancia son mayores a 0,05 y aceptamos H0. Por lo tanto, debe usarse una prueba Paramétrica. Luego, elegimos la prueba paramétrica de T-Student para analizar la varianza del enjuague bucal a base de extracto etanólico de Propóleo y Clorhexidina al 0.12% ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

TABLA 13. Prueba para análisis de varianza, T-Student, para las muestras independientes entre el enjuague bucal a base de extracto etanólico de Propóleo y Clorhexidina al 0.12% ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Agente antibacteriano	Prueba t para igualdad de medias				Sig. (bilateral)
	<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Porphyromonas gingivalis</i>		
	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	
Enjuague bucal a base de EEP	9.95	0.45	8.96	0.13	0.000
Clorhexidina al 0.12%	9.95	0.45	8.96	0.13	

Fuente: Elaboración propia

H0: Los dos agentes antibacterianos son homogéneos.

H1: Los dos agentes antibacterianos tienen diferente sensibilidad bacteriana.

Se realizó la prueba de análisis de varianza T-Student, para demostrar la diferencia de medias entre los resultados de la actividad antibacteriana del enjuague bucal a base de extracto etanólico de Propóleo y gluconato de Clorhexidina al 0.12% ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. De acuerdo a la Tabla 13, se puede ver que el *p* - valor o significancia es menor a 0.05 por lo tanto existe diferencias de las mediciones de los halos de inhibición entre los grupos estudiados.

DISCUSIÓN

Actualmente, como medida preventiva para la caries dental y enfermedad periodontal se dispone de agentes antimicrobianos como la Clorhexidina al 0.12%, que ha demostrado tener excelentes propiedades antibacterianas, pero también efectos secundarios; en tal sentido, en los últimos años se ha propuesto la utilización de agentes naturales como el propóleo que ha sido ampliamente usado en el área de la Medicina como bactericida y bacteriostático, y en el campo de la Odontología como un agente antimicrobiano, antifúngico, anestésico y cicatrizante. (7,8,18)

El presente trabajo evaluó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa, Perú evidenciando formar un halo mayor de 24.50mm ante *S. mutans* ATCC 25175 y un halo mayor de 16.9mm ante *P. gingivalis* ATCC 33277 a una concentración de 31.32 mg/ml del extracto de propóleo respectivamente. La efectividad mostrada se le atribuye a los compuestos fenólicos como el ácido gálico (10.1994 µg/ml) y clorogénico (412.8975 µg/ml) que se identificaron en su caracterización química; como resultado de los cambios que provocan sobre la membrana citoplasmática de bacterias grampositivas y gramnegativas, limitando de esta forma su crecimiento y viabilidad. (20,22) Dziedzic A. et al. (14) evidenciaron que un extracto etanólico de origen polaco compuesto por polifenoles y flavonoides tuvo efecto antibacteriano ante *S. mutans* por la actividad sinérgica de sus compuestos polifenólicos. Esta característica haría del propóleo un agente antimicrobiano con mayor eficacia ya que la combinación y proporción de sus compuestos activos evita la aparición de la resistencia bacteriana. (19,20)

La diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) encontrada en este estudio sobre el tamaño de los halos de inhibición sería indicador de que la concentración de extracto etanólico de propóleo a usar, generaría una menor o superior actividad antibacteriana, lo que se evidencia comparando las concentraciones con las que se trabajó (18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml, 26.1 mg/ml, 28.71 mg/ml y 31.32 mg/ml) con las usadas por Diaz Suyo y Proaño (11) en porcentajes (1%, 5% y 10%) para evaluar el efecto antibacteriano, donde su extracto al 10% presentó una actividad antibacteriana mayor que la Clorhexidina al 0,12%. Jafarzadeh et al. (13)

demonstraron que el extracto etanólico de propóleo a una concentración de 20 mg/ml fue efectivo para inhibir el crecimiento de *S. mutans* (16 ± 0.00) mientras que en el presente estudio a una concentración menor de 18.27mg/ml el extracto de propóleo fue capaz de formar halos de inhibición (6.90 ± 1.70).

Los rangos de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida (29.754-30.537mg/ml) obtenidos con el propóleo de Oxapampa ante *S. mutans* ATCC 25175 y *P. gingivalis* ATCC 33277 fueron opuestos con respecto a la actividad bacteriostática (250-500µg/ml) del propóleo de origen iraní que utilizaron Jafarzadeh et al. (13) ante *S. mutans*, corroborando de esta manera que la efectividad antibacteriana del propóleo es variable dependiendo de la zona geográfica de donde se obtenga.

Con respecto a la actividad antibacteriana del enjuague a base de extracto etanólico de propóleo se demostró que tuvo efecto antibacteriano, formando halos de inhibición mayores que la Clorhexidina al 0.12% (18.28mm) ante *S. mutans* ATCC 25175 (29.7mm) y *P. gingivalis* ATCC 33277 (28.395 mm), similar a lo obtenido por Nazeri et al. (10) donde su enjuague elaborado con propóleo resultó ser más eficiente que la Clorhexidina y Listerine ($P < 0.05$).

El tamaño de los halos de inhibición logrados difiere con los obtenidos por Ayala et al. (15), donde el halo de mayor tamaño fue de 7.93mm ante *S. mutans*; esto debido a que se utilizó un mayor volumen de extracto etanólico de propóleo 30.537mg/ml para elaborar el enjuague; al usado por Ayala et al. (15) de 1.5µg/ml.

Eralp et al. (12) al comparar la efectividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo con el gluconato de Clorhexidina empleando cepas como el *S. mutans* y *P. gingivalis* como en esta investigación, demostraron a su vez que el extracto en concentraciones adecuadas podría servir como un enjuague bucal antimicrobiano natural para evitar los efectos secundarios de la Clorhexidina.

Se puede concluir a través de todo lo expuesto, que la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo, puede ser variada por su composición química y concentración a ser utilizada, como se demostró en esta investigación con la elaboración de un enjuague bucal que mostró tener efecto antibacteriano ante las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC

33277; justificando posteriormente su empleo como herramienta para el control de la enfermedad periodontal y desarrollo de caries, pudiendo llegar a ser una alternativa terapéutica que permita complementar las existentes.

CONCLUSIONES

El estudio concluye:

1. El extracto etanólico de Propóleo tiene propiedades bactericidas ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175, es, resistente (-) para las concentraciones: 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml y 23.49 mg/ml, sensible (+) para las concentraciones: 26.1 mg/ml y 28.71 mg/ml, y muy sensible (++) para la concentración 31.32 mg/ml. La sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de Propóleo ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es, sensible (+) para las concentraciones: 18.27 mg/ml, 20.88 mg/ml, 23.49 mg/ml y 26.1 mg/ml, y muy sensible (++) para las concentraciones: 28.71 mg/ml y 31.32 mg/ml.
2. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue de 29.754 mg/ml (T₅) y ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 de 30.276 mg/ml (T₇), lo que evidencia que esta última cepa necesita una mayor concentración de extracto para comenzar a inhibir el crecimiento bacteriano.
3. La concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 corresponde a una concentración de 30.276 mg/ml; y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Propóleo ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 corresponde a una de 30.798 mg/ml.

4. La actividad antibacteriana del enjuague bucal elaborado a base de extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es sumamente sensible (+++) en la escala de Duraffourd y Lapraz, con una media de 28.236 mm del halo de inhibición y un rango 3.79 mm. En caso de la actividad antibacteriana del mismo enjuague bucal ante *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es sumamente sensible (+++), con una media de 27.754 mm del halo de inhibición y un rango 1.265 mm. Comparando las dos actividades antibacterianas, ante *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 tiene un comportamiento no uniforme en comparación a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, que es más homogéneo y uniforme.

5. La sensibilidad bacteriana del enjuague a base de extracto etanólico de Propóleo ante *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 es sumamente sensible (+++). Además, de ser más eficiente que la Clorhexidina al 0.12%.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda para próximas investigaciones probar el dimetilsulfóxido (DSMO) como fuente de dilución para el extracto etanólico de propóleo.
2. Se sugiere evaluar si alguno de los componentes utilizados para la elaboración del enjuague bucal provoca un efecto sinérgico en la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo.
3. Se recomienda evaluar la existencia o no de citotoxicidad del enjuague bucal experimental a base del extracto etanólico de propóleo para un posterior uso clínico.
4. Habiéndose demostrado el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa, Perú; se recomienda potenciar el estudio y pruebas para su posterior uso clínico, con evaluación in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zambrano AIY, Solórzano AMA. Consideraciones sobre la enfermedad periodontal y su control. *Dominio Las Cienc.* 2016;2(Extra 0):3-12.
2. Núñez DP, García Bacallao L. Bioquímica de la caries dental. *Rev Habanera Cienc Médicas.* junio de 2010;9(2):156-66.
3. Astorga B, Barraza C, Casals JM, Cisterna MJ, Mena D, Morales F, et al. Avances en el Estudio de la Diversidad Bacteriana Oral Asociada a Caries Dental Mediante el Estudio Genómico. *Int J Odontostomatol.* diciembre de 2015;9(3):349-56.
4. Bautista Molano W, Unriza Puin SR, Carlos Munevar J, Lafaurie G, Valle Oñate RR, Romero Sánchez MC. Papel de la enfermedad periodontal en el desarrollo de entidades inflamatorias de etiología autoinmune: implicaciones clínicas y desafíos terapéuticos. *Rev Colomb Reumatol.* junio de 2012;19(2):84-91.
5. Carvalho C de, Fernandes WHC, Moutinho TBF, Souza DM de, Marcucci MC, D'Alpino PHP. Evidence-Based Studies and Perspectives of the Use of Brazilian Green and Red Propolis in Dentistry. *Eur J Dent.* julio de 2019;13(3):459-65.
6. Dodwad V, Kukreja BJ. Propolis mouthwash: A new beginning. *J Indian Soc Periodontol.* 2011;15(2):121-5.
7. Więckiewicz W, Miernik M, Więckiewicz M, Morawiec T. Does propolis help to maintain oral health? *Evid-Based Complement Altern Med ECAM;*2013:351062.
8. Hwu YJ, Lin FY. Effectiveness of Propolis on Oral Health: A Meta-Analysis. *J Nurs Res.* diciembre de 2014;22(4):221-30.

9. Abbasi AJ, Mohammadi F, Bayat M, Gema SM, Ghadirian H, Seifi H, et al. Applications of Propolis in Dentistry: A Review. *Ethiop J Health Sci.* julio de 2018;28(4):505-12.
10. Jafarzadeh Kashi TS, Kasra Kermanshahi R, Erfan M, Vahid Dastjerdi E, Rezaei Y, Tabatabaei FS. Evaluating the In-vitro Antibacterial Effect of Iranian Propolis on Oral Microorganisms. *Iran J Pharm Res IJPR.* 2011;10(2):363-8.
11. Dziedzic A, Kubina R, Wojtyczka RD, Kabała-Dzik A, Tanasiewicz M, Morawiec T. The antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans streptococci and lactobacilli isolated from saliva. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM.* 2013:681891.
12. Akca AE, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen İŞ. The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Res Int.*;2016:1-8.
13. Nazeri R, Ghaiour M, Abbasi S. Evaluation of Antibacterial Effect of Propolis and its Application in Mouthwash Production. *Front Dent.* 2019;16(1):1-12.
14. Suyo JAD, Casalino DP de. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. *Rev Estomatológica Hered.* 2011;21(3):125-125.
15. Ayala Jara CI, Castillo Saavedra EF, Graus Mejía L, Casanova Luján J, Seclén Ayala LE. Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana. *Arnaldoa.* 2016;23(1):171-84.
16. Ara A, Roldán AA. *Los Grandes Remedios Naturales.* EDAF; 2003. 268 p.
17. Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* [Internet]. 29 de mayo de 2019 [citado 4 de junio de 2020];24(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6600457/>

18. Khurshid Z, Naseem M, Zafar MS, Najeeb S, Zohaib S. Propolis: A natural biomaterial for dental and oral healthcare. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2017;11(4):265-74.
19. de Groot AC. Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermat Contact Atopic Occup Drug*. diciembre de 2013;24(6):263-82.
20. Noriega Salmón V. El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. Propolis, another therapeutic resource in the clinical training [Internet]. 26 de septiembre de 2014 [citado 4 de junio de 2020]; Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/5580>
21. Muñoz Rodríguez LC, Linares Villalba SE, Narváez Solarte W. PROPOLIS PROPERTIES AS FUNCTIONAL NATURAL ADDITIVE ON ANIMAL NUTRITION. *Biosalud*. diciembre de 2011;10(2):101-11.
22. Rosal E del R del, Arrojo VC, Turpín EMG, Gómez JG, Díaz RA, Figueroa FL. Estudio de la actividad antioxidante y antitumoral del propóleo. *Ars Pharm Internet*. 28 de junio de 2017;58(2):75-81-81.
23. Sánchez Rubio I, Rubio Mirón A. Atención farmacéutica en la enfermedad periodontal (y II). *Plantas medicinales. Offarm*. 1 de julio de 2010;29(4):62-7.
24. de Carvalho Furtado JH, Rocha Valadas LA, Mendonça KS, de Oliveira Filho RD, Gadelha LMU, de Mello Fiallos N, et al. Propolis and its Dental Applications: A Technological Prospection. *Recent Pat Biotechnol*. 2018;12(4):288-96.
25. S. VKL. Propolis in Dentistry and Oral Cancer Management. *North Am J Med Sci*. junio de 2014;6(6):250-9.
26. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. Streptococcus mutans and dental caries. *CES Odontol*. enero de 2013;26(1):44-56.
27. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. Streptococcus mutans, Caries and Simulation Models. *Nutrients*. 2 de marzo de 2010;2(3):290-8.

28. Ingraham JL, Ingraham CA. Introducción a la microbiología. II. Reverte; 1998. 508 p.
29. Orrego-Cardozo M, Parra-Gil MA, Salgado-Morales YP, Muñoz-Guarín E, Fandiño-Henao V. Porphyromonas gingivalis and systemic diseases. CES Odontol. junio de 2015;28(1):57-73.
30. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. Cell Host Microbe. 17 de noviembre de 2011;10(5):497-506.
31. Huaytalla Alemán RM, Gálvez Ramírez CM, Carhuapoma-Yance M, Alvarez-Paucar MA, López Guerra S. Efecto inhibitor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% ante cepas de Lactobacillus acidophilus. Rev Estomatológica Hered. enero de 2018;28(1):36-43.
32. Salamanca Grosso G. Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo [Internet]. Sello Editorial Universidad del Tolima. 2017 [citado 25 de enero de 2021]. Disponible en: <https://elibro.net/es/ereader/bibliotecaupt/105718?page=45>
33. Duraffourd C. y Lapraz J. Cuaderno de fitoterapia clínica. Francia: Masson; 1983.
34. Quiroz B, Marines L. Efecto antibacteriano in vitro de un enjuague bucal a diferentes concentraciones a base de extracto etanólico de stevia rebaudiana sobre el crecimiento de streptococcus mutans ATCC 25175. Univ Nac Trujillo [Internet]. 2016 [citado 20 de mayo de 2020]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1135>

ANEXOS

ANEXO 01. CONSTANCIA DE CÓMITE DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

	UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA	FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD	CODIGO: 54/FACSA/UI
	COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION		Hoja 1 de 1

CONSTANCIA

El que suscribe, presidente del comité institucional de ética en investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, deja constancia que el proyecto de investigación titulado "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN ENJUAGUE BUCAL ELABORADO A BASE DE EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. ESTUDIO IN VITRO. TACNA, 2020"., ha sido evaluado y aprobado por nuestro comité, no habiéndose encontrado objeciones en dicho proyecto de acuerdo a los estándares propuestos. Dicho proyecto fue presentado por investigador Yacyin Duvaly Vargas Gonzales (Investigador Principal)

La fecha de aprobación tendrá vigencia desde el 24 de Marzo del 2021 hasta el 23 de Marzo del 2022.

Asimismo, le solicitamos hacer llegar el informe de avance de ejecución del proyecto; donde comunicará el inicio de la ejecución del estudio e informará, en los eventos asociados y no asociados con el estudio, la evidencia de beneficio, los riesgos desfavorables, el rechazo de participación de los sujetos, el número de participantes enrolados y/o cualquier antecedente importante que se observe durante la ejecución de la investigación.

Tacna, 24 de Marzo del 2021



Presidente
Comité Institucional de Ética en investigación

ANEXO 02. CONSTANCIA DE REALIZACIÓN DE PARTE EXPERIMENTAL.



Universidad Nacional "Jorge Basadre Grohmann" - Tacna
FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de: Biología-Microbiología, Física Aplicada y Matemática



CONSTANCIA

Se hace constar que la Bachiller de la Escuela de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna Señorita Yaeyín Duvaly Vargas Gonzales con código de matrícula N° 2014-047507 y con documento de Identidad N° 72289875 realizó la parte experimental de su tesis titulada "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN ENJUAGUE BUCAL ELABORADO A BASE DE EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. ESTUDIO *IN VITRO*. 2020" Con fecha del 1 de diciembre del 2021 al 07 de enero del 2022.

La presente se extiende a petición del interesado para los fines que el estime a los nueve días del mes de febrero del 2022.

Atentamente



Biólogo - Microbiólogo
Especialista del laboratorio de Microbiología
Edwin Denis Obando Velarde
BIOLOGO - MICROBIOLOGO

Ciudad Universitaria Av. Miraflores s/n
Apartado 316 Teléfono:052-583000 Anexo: 2102 - Fax: 2101

ANEXO 03. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha: / /

FICHA 1. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Streptococcus mutans*.

EEP		Halos de inhibición (mm)								
Volumen (µl)	Concentración (mg/ ml)	1era repetición	2da repetición	3era repetición	4ta repetición	5ta repetición	6ta repetición	7ma repetición	8va repetición	Promedio final
17.5										
20.0										
22.5										
25										
27.5										
30										
Control	Positivo (CHX)									
Control	Negativo (dH2O)									

Fecha: / /

FICHA 2. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Porphyromonas gingivalis*.

EEP		Halos de inhibición (mm)								
Volumen (µl)	Concentración (mg/ ml)	1era repetición	2da repetición	3era repetición	4ta repetición	5ta repetición	6ta repetición	7ma repetición	8va repetición	Promedio final
17.5										
20.0										
22.5										
25										
27.5										
30										
Control	Positivo (CHX)									
Control	Negativo (dH ₂ O)									

Fecha: / /

FICHA 3. Recolección de datos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Streptococcus mutans*.

Tubo	Concentración inicial (mg/ ml)	Concentración final (mg/ ml)	Solución madre (µl)	Suspensión bacteriana (µl)	BHI (µl)	TOTAL (µl)	Turbidez de CMI
T ₁							
T ₂							
T ₃							
T ₄							
T ₅							
T ₆							
T ₇							
T ₈							
T ₉							
T ₁₀							
T ₁₁							
T ₁₂	c+						
T ₁₃	c-						

Positivo (+): Indica crecimiento **c+:** Control positivo (BHI + Bacteria)

Negativo (-): Ausencia de crecimiento **c-:** Control negativo (BHI)

Fecha: / /

FICHA 4. Recolección de datos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Porphyromonas gingivalis*.

Tubo	Concentración inicial (mg/ ml)	Concentración final (mg/ ml)	Solución madre (µl)	Suspensión bacteriana (µl)	BHI (µl)	TOTAL (µl)	Turbidez de CMI
T ₁							
T ₂							
T ₃							
T ₄							
T ₅							
T ₆							
T₇							
T₈							
T₉							
T ₁₀							
T ₁₁							
T ₁₂	c+						
T ₁₃	c-						

Positivo (+): Indica crecimiento **c+:** Control positivo (BHI + Bacteria)

Negativo (-): Ausencia de crecimiento **c-:** Control negativo (BHI)

Fecha: / /

FICHA 5.

Recolección de datos de concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Streptococcus mutans*.

Tubo	Concentración final (Mg/ µl)	UFC
T ₅		
T ₆		
T ₇		
T ₈		

Recolección de datos de concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Porphyromonas gingivalis*.

Tubo	Concentración final (Mg/ µl)	UFC
T ₇		
T ₈		
T ₉		

Fecha: / /

FICHA 6. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del enjuague a base extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Streptococcus mutans*.

Agente antibacteriano	Halos de inhibición (mm)								
	1era repetición	2da repetición	3era repetición	4ta repetición	5ta repetición	6ta repetición	7ma repetición	8va repetición	Promedio final
Enjuague bucal a base de EEP									
Clorhexidina al 0.12%									
Enjuague bucal placebo									

FICHA 7. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del enjuague a base extracto etanólico de propóleo (EEP) ante *Porphyromonas gingivalis*.

Agente antibacteriano	Halos de inhibición (mm)								
	1era repetición	2da repetición	3era repetición	4ta repetición	5ta repetición	6ta repetición	7ma repetición	8va repetición	Promedio final
Enjuague bucal a base de EEP									
Clorhexidina al 0.12%									
Enjuague bucal placebo									

ANEXO 04. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRFIA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973666655

RESULTADOS

Cusco, 15 de Febrero del 2022^{04a}

Solicitante : Yaeyin Duvali Vargas Gonzales
Universidad Privada de Tacna
Tipo de Análisis : Ensayo Fitoquímico
Método de Análisis : Reacciones de coloración y/o precipitación
Tipo de Muestras : Denominado "Extracto de Propoleo"
Cantidad de Muestra : 1, Frasco con un líquido naranja aprox 20 ml
Almacenamiento : 4 °C.

Muestra	Flavonoides	Compuestos Fenólicos	Alcaloides	Triterpenos y Esteroides	Saponinas	Taninos	Quinonas
1 Extracto de Propoleo	++	+++	-	-	-	++	-

Abundante = (+++), Poco = (++) , Muy Poco = (+), Ausente = (-)

Nota: El ensayo fitoquímico realizado al extracto acuoso consistió en reacciones de coloración y/o precipitación, donde se evaluó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios.

Referencia

- Lock de Ugaz O. (1994) "Investigación Fitoquímica" Métodos en el estudio en los productos naturales 2da Ed, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima. ISBN 8483909529



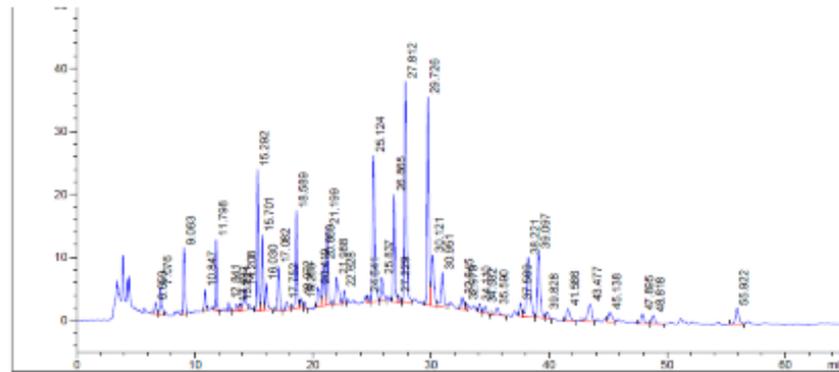
Químico. Jorge Choquenaira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría – UNSAAC.
CQP - 914



RESULTADOS

Cusco, 15 de Febrero del 2022 ^{04b}

Solicitante : Yaeyin Duvali Vargas Gonzales
 Universidad Privada de Tacna
 Tipo de Análisis : Perfil de compuestos Fenolicos
 Método de Análisis : Cromatografía liquida HPLC-DAD
 Tipo de Muestras : Denominado "Extracto de Propoleo"
 Cantidad de Muestra : 1, Frasco con un líquido naranja aprox 20 ml
 Almacenamiento : 4 °C.



Muestra	Acido Gálico ug/mL de extracto	Acido Clorogénico ug/mL de extracto
Extracto de Propoleo	10.1994	412.8975

Nota:

Se ha detectado la presencia de 46 compuestos en el perfil para compuestos fenólicos, de los cuales solo se ha evidenciado la presencia de ácido Gálico y Clorogénico mediante la evaluación de la coincidencia del tiempo de retención y el espectro UV de la muestra frente al estándar de ácido Gálico y Clorogénico, las cantidades presentes en la muestra se determino mediante una curva de calibración de una mezcla de estándares



Químico. Jorge Choquenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914

ANEXO 06. GALERÍA FOTOGRÁFICA



Figura N° 7-8-9: Recolección de propóleo.

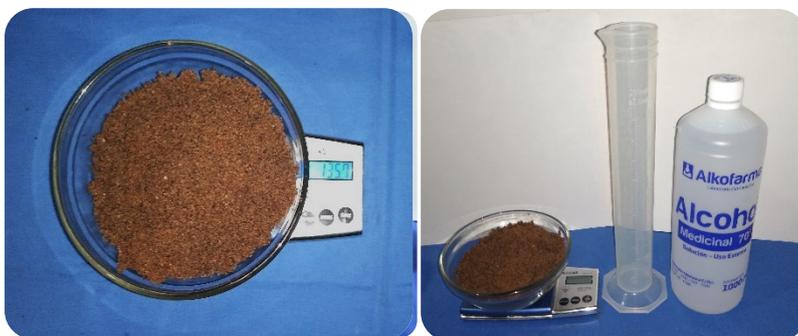


Figura N° 9-10-11: Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP).



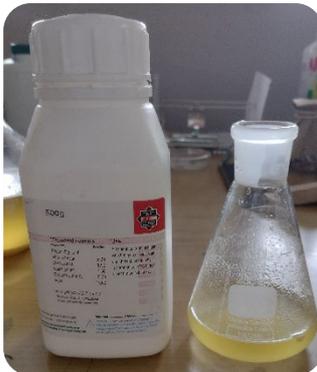
Figura N° 12-13-14: Filtración del extracto etanólico de propóleo (EEP).



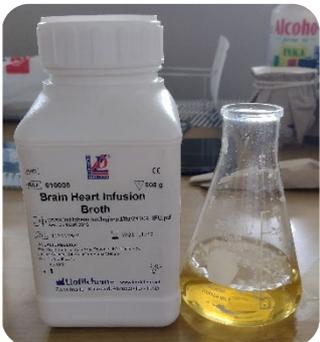
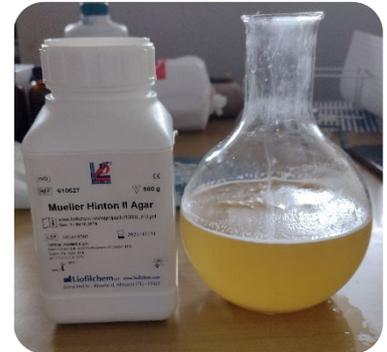
Figura N°15: Muestra de EEP para la caracterización físico-química.



Figura N° 16-17-18: Obtención de las concentraciones de extracto etanólico de propóleo.



Viales con agar nutritivo



Tubos de ensayo con BHI



Placas con Agar Müller Hinton

Figura N° 19-20-21-22-23-24: Preparación de los medios de cultivo para *S. mutans* y *P. gingivalis*.

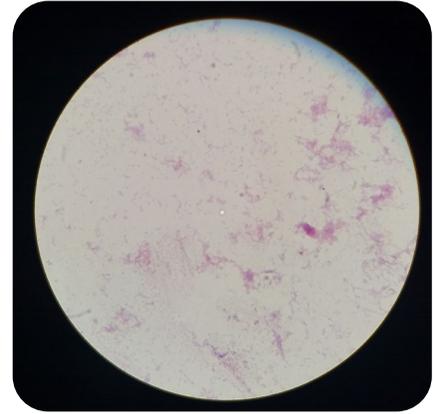
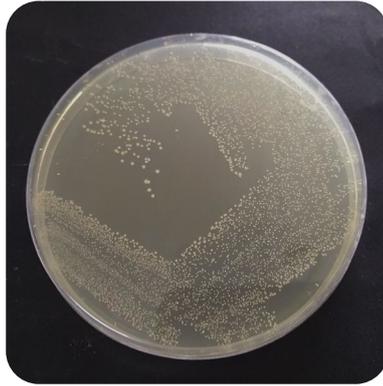


Figura N° 25-26: Activación de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175.

Figura N° 27: Cepa de *S. mutans* ATCC 25175 viable.

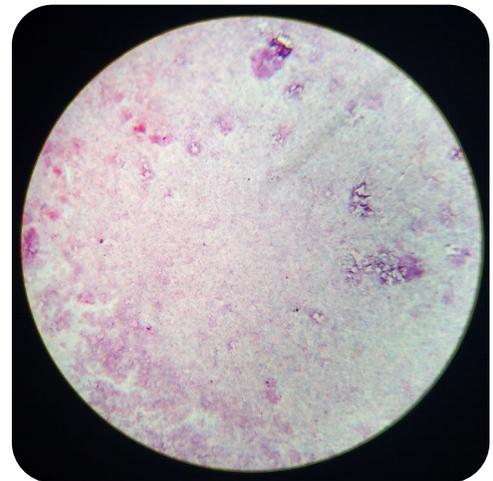


Figura N° 31: Cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277



Figura N° 28-29-30: Activación de la cepa de *P. gingivalis* ATCC 33277.



Figura N° 32-33: Estandarización a la escala 0.5 de Mc Farland de las cepas de *S. mutans* y *P. gingivalis*.

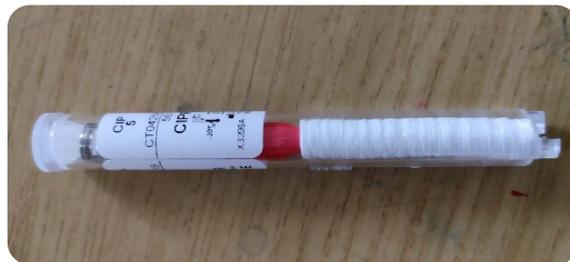


Figura N° 34: Discos de sensibilidad para el proceso desnaturalización y posterior aplicación del EEP.

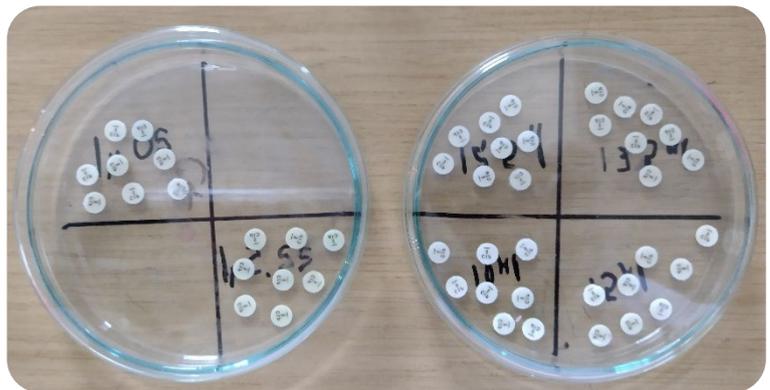


Figura N° 35-36: Discos de papel embebidos con extracto etanólico de propóleo en diferentes concentraciones.



Figura N° 37-38: Inoculación de las cepas de *S. mutans* y *P. gingivalis* en placas petri.



Figura N° 39: Aplicación de los discos embebidos con EEP en placas petri.



Figura N° 40: Incubación de las placas petri con las cepas de *S. mutans* y *P. gingivalis* y discos con EEP.

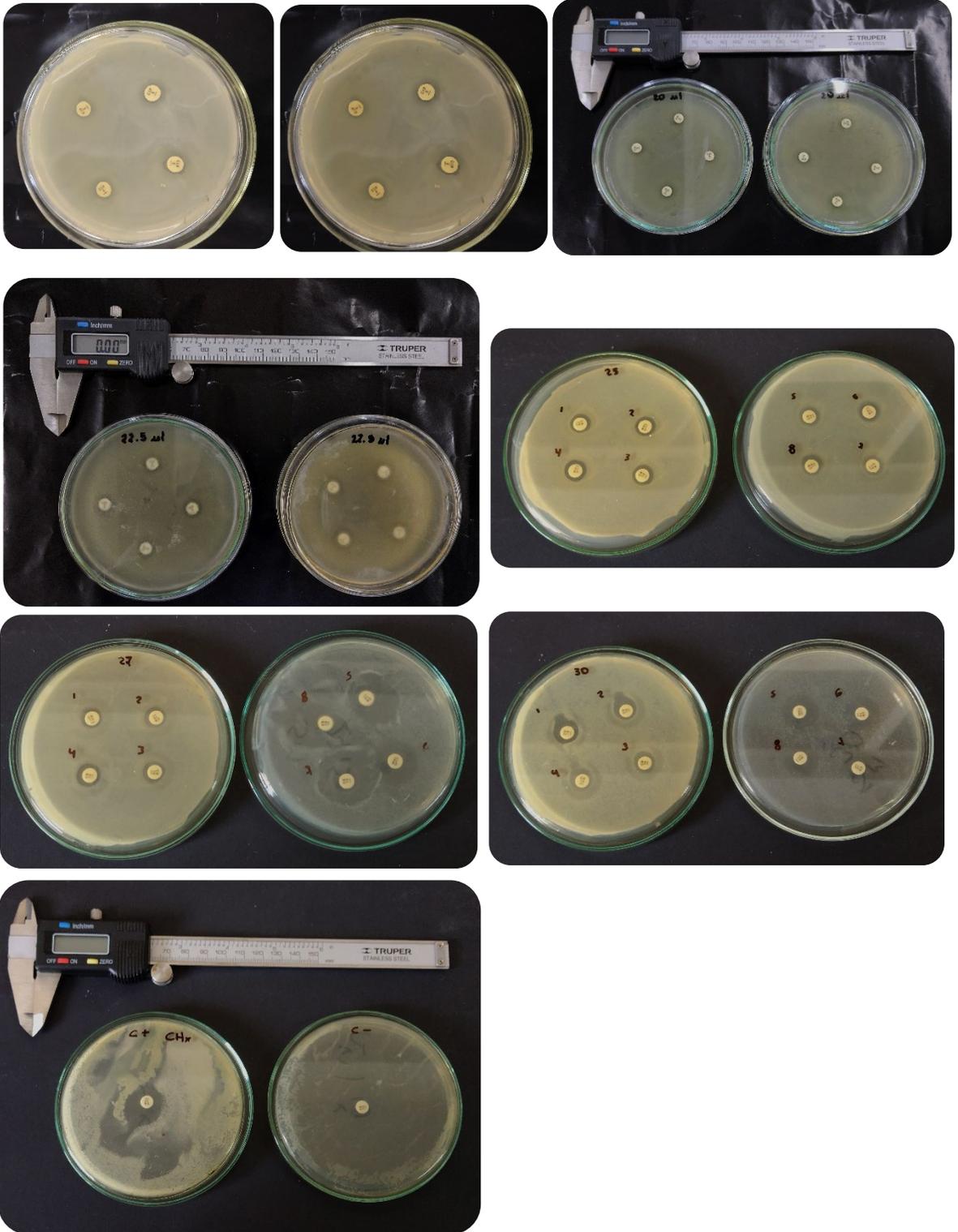


Figura N° 41-42-43-44-45-46-47-48: Lectura de los halos de inhibición del EEP ante *S. mutans*.

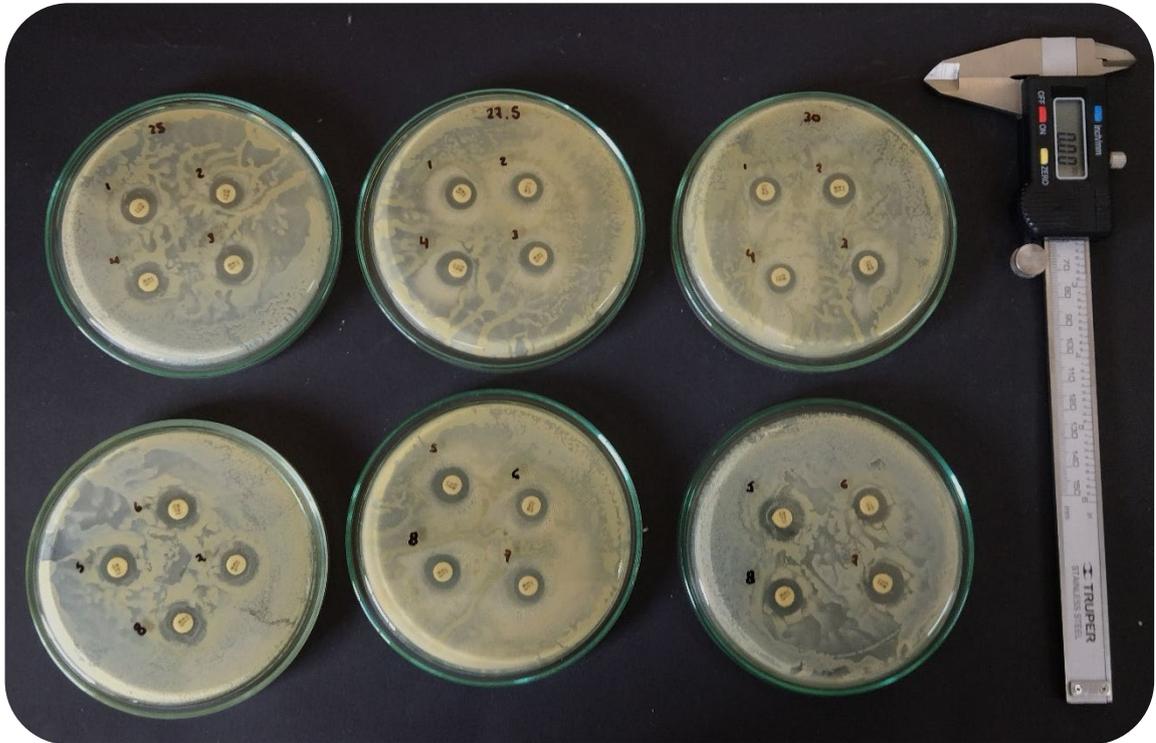
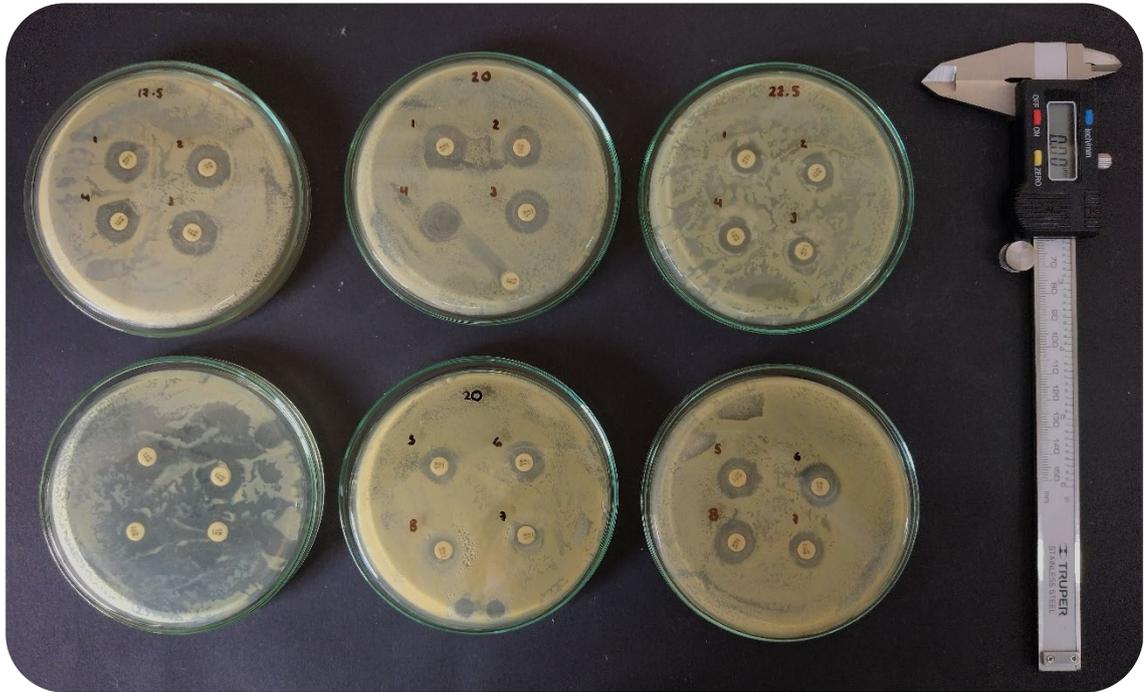


Figura N° 49-50: Lectura de los halos de inhibición del EEP ante *P. gingivalis*.



Figura N° 51-52-53-: Preparación de la Solución madre.



Figura N° 54-55-: Preparación de los tubos de ensayo para la determinación del CMI.

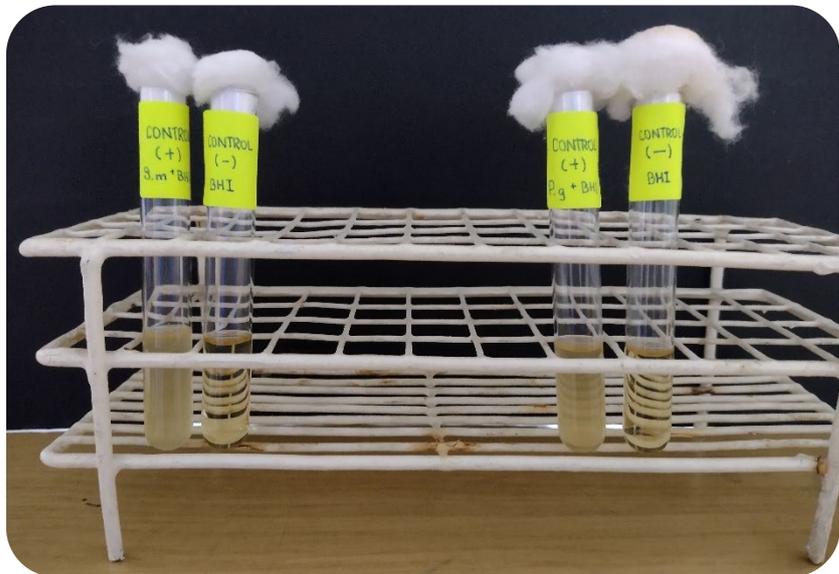
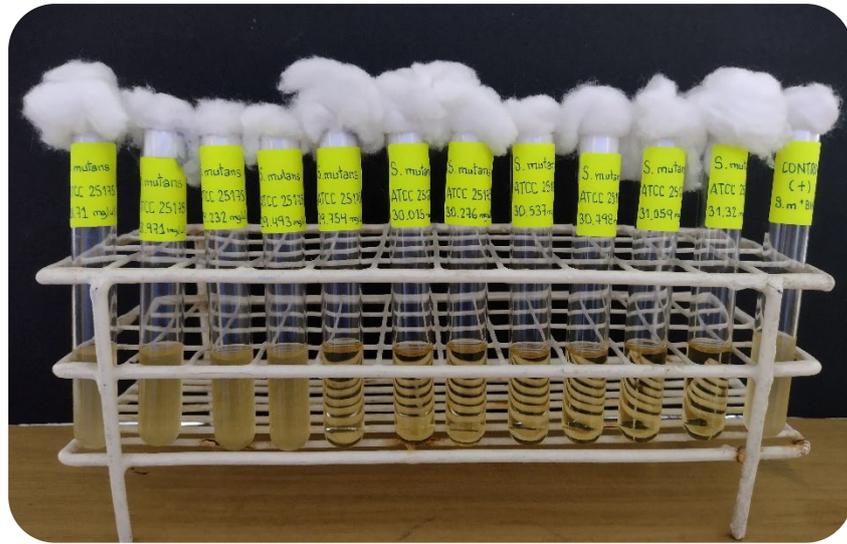


Figura N° 56-57-58: Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

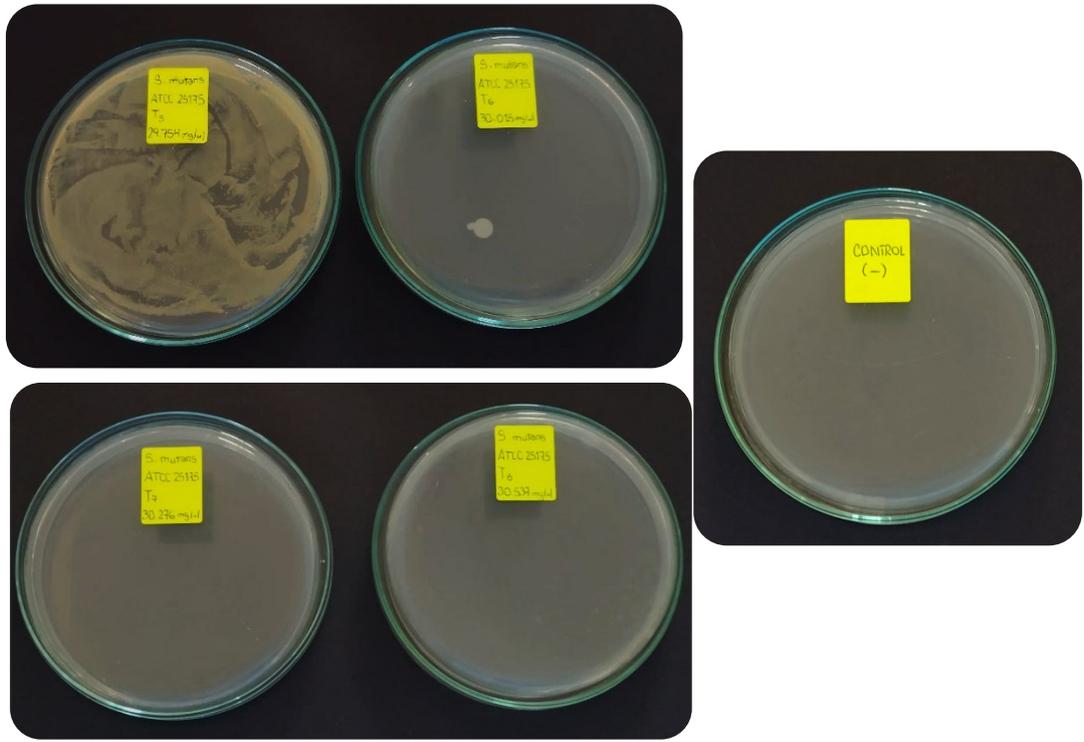


Figura N° 59-60-61: Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleo ante *Streptococcus mutans*.

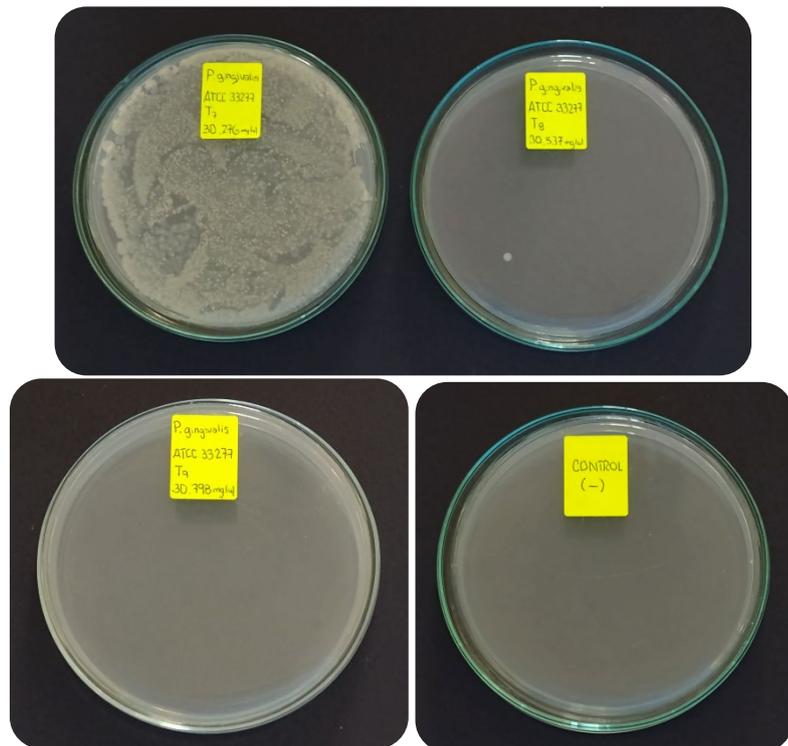


Figura N° 62-63-64: Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleo ante *Porphyromonas gingivalis*.



Figura N° 65: Materiales para la preparación del enjuague bucal a base de EEP.

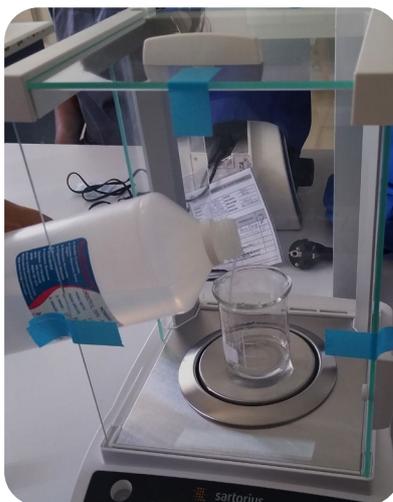
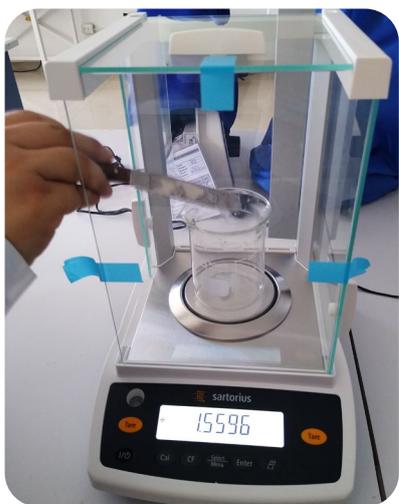


Figura N° 66-67-68-69-70: Preparación del enjuague bucal a base de EEP.

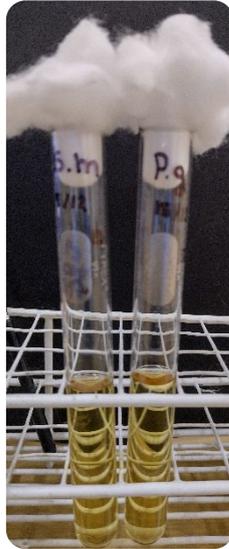


Figura N° 71-72-73-74-75-76: Activación de las cepas de *S. mutans* y *P. gingivalis* y estandarización en base a la escala 0.5 de Mc Farland

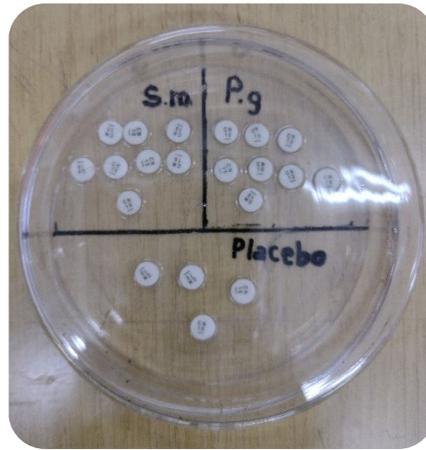


Figura N° 77-78-79-80: Distribución de discos y aplicación del enjuague bucal a base de extracto etanólico de propóleo y enjuague placebo.

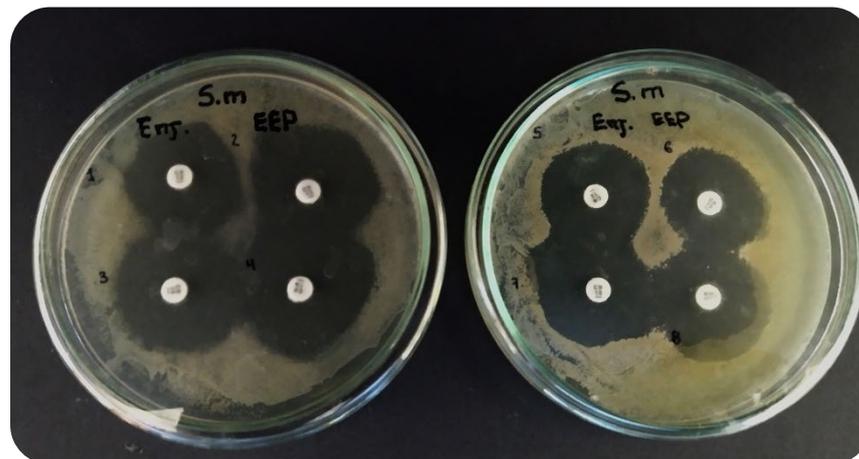


Figura N° 81: Lectura de los halos de inhibición del enjuague elaborado a base de extracto etanólico de propóleo ante *S. mutans*.

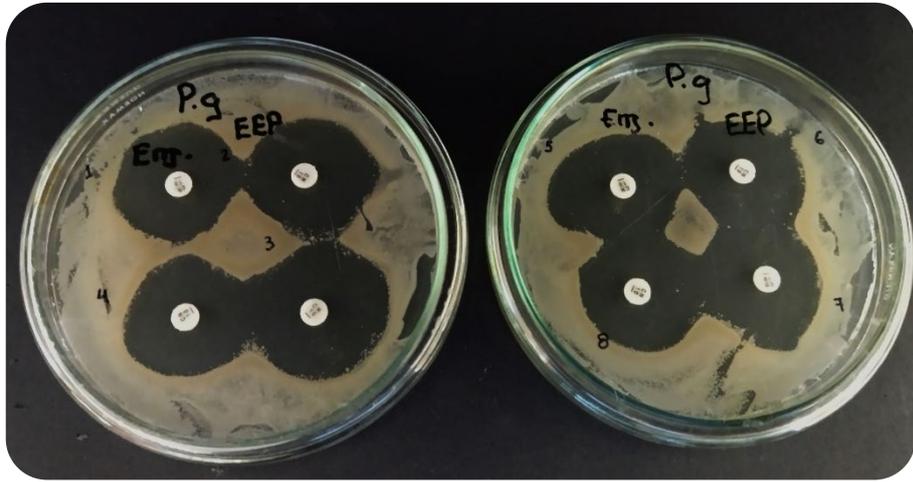


Figura N° 82: Lectura de los halos de inhibición del enjuague elaborado a base de extracto etanólico de propóleo ante *P. gingivalis*.

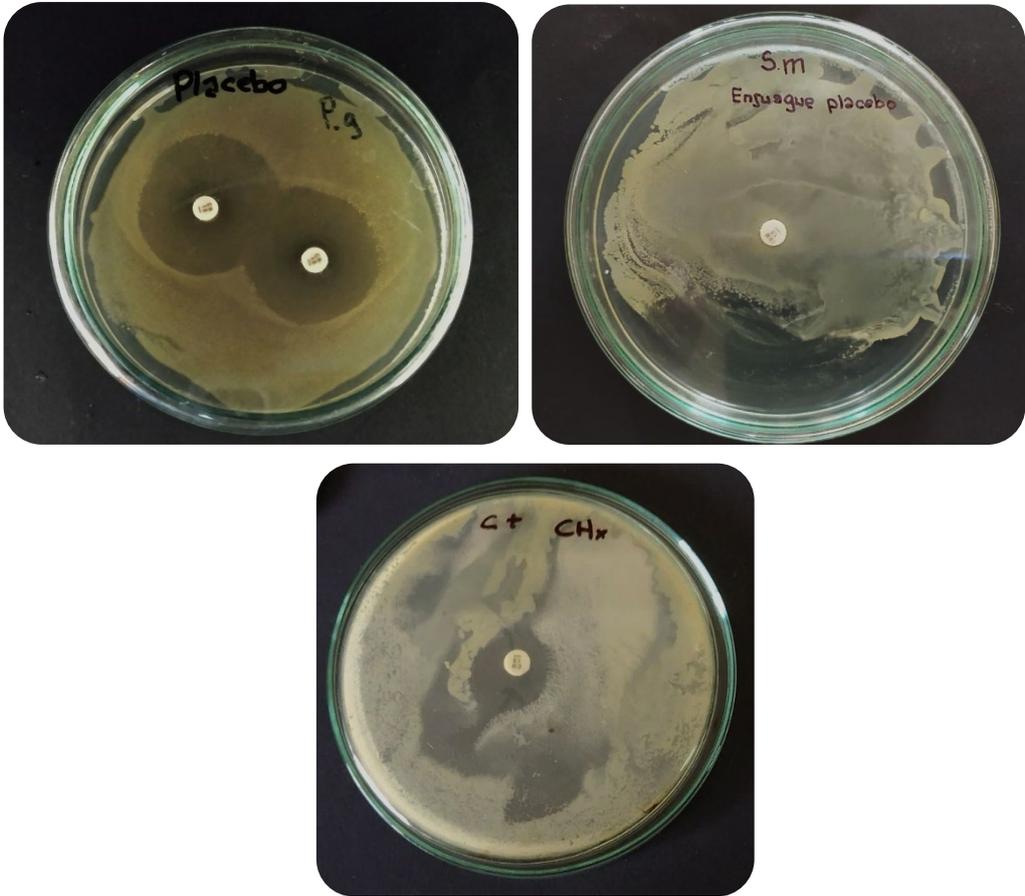


Figura N° 83: Control positivo y Control negativo.