



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIFÚNGICO  
ENTRE EL EXTRACTO HIDROETANÓLICO MIXTO DE  
MIEL Y PROPÓLEO DE *Apis mellifera* vs. EXTRACTO  
HIDROETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE  
*Candida albicans* ATCC 10231, TRUJILLO - 2018

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
CIRUJANO DENTISTA

**AUTORA:**

ELÍAS PRADO KATHERINE ELIZABETH

**ASESOR:**

MGTR. CÉSAR ABRAHAM VÁSQUEZ PLASENCIA

TRUJILLO – PERÚ

**2019**

# **TÍTULO DE LA TESIS**

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIFÚNGICO  
ENTRE EL EXTRACTO HIDROETANÓLICO MIXTO DE  
MIEL Y PROPÓLEO DE *Apis mellifera* vs. EXTRACTO  
HIDROETANÓLICO DE PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE  
*Candida albicans* ATCC 10231, TRUJILLO - 2018**

## **EQUIPO DE TRABAJO**

### **INVESTIADOR PRINCIPAL:**

Elías Prado Katherine Elizabeth

### **ASESOR:**

Mgtr. Vásquez Plasencia César Abraham.

**JURADO EVALUADOR DE TESIS**

---

**Dr. AGUIRRE SIANCAS ELÍAS ERNESTO**

**PRESIDENTE**

---

**Mgtr. MORÓN CABRERA EDWAR RICHARD**

**MIEMBRO**

---

**Mgtr. PAIRAZAMÁN GARCÍA JUAN LUIS**

**MIEMBRO**

---

**Mgtr. VÁSQUEZ PLASENCIA CÉSAR ABRAHAM**

**ASESOR**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por ser fuente de inspiración ante los momentos más difíciles de mi carrera.

Agradecer a mi centro de estudios la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, sede Trujillo; por ser parte de mi formación durante todos estos 5 años de mi carrera universitaria.

Un agradecimiento muy importante al Dr. César Vásquez Plasencia, que con su perseverancia, conocimientos y paciencia, me orientó y permitió que lograra la culminación de mi tesis.

También quiero agradecer a todos mis docentes de la escuela profesional de odontología de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, sede Trujillo; por todas sus enseñanzas que me han brindado todos estos años.

## **DEDICATORIA**

Agradezco a Dios, por estar siempre a mi lado, protegiéndome y guiándome en este largo camino de mi vida, por ser esa inspiración de fe y esperanza ante mis angustias, por darme vida todos los días y por tener a mi lado a las personas que más amo.

A mis padres, por haberme apoyado en todos estos años de mi formación académica hasta lograr ser una profesional, por brindarme sus tiempos, por sus esfuerzos y sacrificios que hicieron por mí, por guiarme y cuidarme hasta ahora con sus consejos. Agradezco también a mi hermana Cynthia, por todos sus consejos.

A Miler Mendoza, por haberme acompañado en casi toda mi carrera universitaria, por brindarme siempre su apoyo incondicional, por exigirme cada día para ser mejor, por haberme ayudado también con mi tesis, por ser como un hermano que está en los buenos y malos momentos.

Y finalmente quiero agradecer al señor Ulises, apicultor de Otuzco - Trujillo, quién con su amabilidad y sus enseñanzas, me ayudó con la obtención de mis productos naturales para la realización de mi tesis.

## RESUMEN

El estudio comparó el efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo de *Apis mellífera* vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. El diseño fue experimental, prospectivo y transversal. La muestra estuvo conformada por 15 placas petris sembradas con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizó 10 repeticiones por cada concentración. La evaluación del efecto de los extractos hidroetanólico de miel y propóleo se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar. Los discos fueron colocados sobre las placas de Müeller Hinton, durante 24 horas las placas estuvieron en posición invertida a 37°C. Para el extracto hidroetanólico mixto de miel con propóleo presentó halos de inhibición de 18.50 mm y el extracto hidroetanólico de propóleo de 18.20 mm. No se encontró diferencia estadística significativa entre los dos grupos de concentración con un nivel de significancia estadística ( $p < 0.05$ ), utilizando la prueba estadística de t de student, ya que los datos siguieron una distribución normal. Se concluyó que al comparar el extracto hidroetanólico mixto con el extracto hidroetanólico del propóleo obtenemos el mismo efecto antifúngico sobre cepas de *Candida albicans*.

Palabras claves: Candidiasis oral, Antifúngico, Fitoterapia.

## **ABSTRACT**

The study compared the antifungal effect between the mixed hydroethanolic extract of honey and propolis of *Apis mellifera* vs. hydroethanolic extract of propolis on strains of *Candida albicans* ATCC 10231. The design was experimental, prospective and transversal. The sample consisted of 15 petris plates planted with strains of *Candida albicans* ATCC 10231. 10 repetitions were performed for each concentration. The evaluation of the effect of the hydroethanolic extracts of honey and propolis was carried out using the Kirby Bauer agar diffusion method. The discs were placed on the plates of Müeller Hinton, during 24 hours the plates were in an inverted position at 37 ° C. For the mixed hydroethanolic extract of honey with propolis, there was an inhibition halos of 18.50 mm and the hydroethanolic extract of propolis of 18.20 mm. No statistically significant difference was found between the two concentration groups with a level of statistical significance ( $p < 0.05$ ), using the student's t-test, since the data followed a normal distribution. It was concluded that when buying the mixed hydroethanolic extract with the hydroethanolic extract of propolis we obtain the same antifungal effect on strains of *Candida albicans*.

Key words: Oral candidiasis, Antifungal, Phytotherapy.

## CONTENIDO

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de Trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iv
4. Agradecimiento.....	v
5. Dedicatoria.....	vi
6. Resumen.....	vii
7. Abstract.....	viii
8. Contenido .....	ix
9. Índice de tablas.....	x
10. Índice de gráficos.....	xi
I. Introducción.....	01
II. Revisión de literatura.....	03
III. Hipótesis.....	19
IV. Metodología.....	19
4.1 Diseño de la investigación.....	19
4.2 Población y muestra.....	20
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	22
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	23
4.5 Plan de análisis.....	28
4.6 Matriz de consistencia.....	29
4.7 Principios éticos.....	30
V. RESULTADOS.....	30
5.1 Resultados.....	31
5.2 Análisis de resultados.....	34
VI. CONCLUSIONES.....	36
Aspectos complementarios.....	36
Referencias bibliográficas.....	37
Anexos.....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Evaluación del efecto antifúngico de extracto hidroetanólico de propóleo, extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo, extracto hidroetanólico de miel, etanol y nistatina sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	<b>31</b>
<b>Tabla 2.</b> Comparación del efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleos sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	<b>32</b>
<b>Tabla 3.</b> Comparación del efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleos sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b> Comparar el efecto antifúngico, entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231. Determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, método Kirby Bauer.....	<b>54</b>
<b>Tabla 5.</b> Pruebas de normalidad.....	<b>55</b>

## INDICE DE GRÁFICOS

- Grafico 1.** Evaluar el efecto antifúngico de extracto hidroetanólico de propóleo, extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo, nistatina sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.....56
- Grafico 2.** Comparación del efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.....56
- Grafico 3.** Comparación del efecto antifúngico de extracto hidroetanólico mixto de miel con propóleo y Nistatina sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.....57

## I. INTRODUCCIÓN

La cavidad bucal constituye un ambiente favorable para la colonización de microorganismos oportunistas como la levadura *Candida albicans* el principal mediador etiológico de la candidiasis bucal, por tal motivo se considera que cuatro de cada mil pacientes que acuden a una consulta odontológica presentan síntomas y signos de infección candidiásica.<sup>1,2</sup>

La cepa "*Candida albicans*" ha sido considerada como la especie más patogénica dentro de su género, misma que pudo ser responsable de infecciones micóticas en cavidad bucal, vaginal, gastrointestinal entre otras, incluso en estados más graves se ha observado una diseminación en el organismo que ha producido septicemias e incluso la muerte. Por otra parte existen estudios donde se afirma que se han encontrado una gran variedad de microorganismos en la cavidad bucal que generalmente viven en un estado de equilibrio, sin embargo se ha observado que cuando este estado se altera aparece la enfermedad.<sup>3,4</sup>

El propóleo es una sustancia resinosa, son de solidez pegajosa, tiene actividad contra bacterias y virus, es antimicótico, combate la inflamación y el dolor, ayuda a cicatrizar heridas, activando y favoreciendo que se regeneren los tejidos afectados.<sup>5</sup>

La miel de abeja ha sido considerada como un producto medicinal desde ya hace mucho tiempo, pero estudios recientes han demostrado sus propiedades inmunobiológicas, antibacteriana, antiinflamatorias, regenerativas, como agente antimicótico, etc.<sup>6</sup>

Es importante considerar varias opciones para ayudar con el control o la eliminación de esta cepa, tomando en cuenta que una alternativa es optar por la medicina

tradicional o natural presentes en extractos, aceites esenciales u otros productos, en este caso el presente estudio está a base de estas dos sustancias adquiridas por un insecto muy valioso, ya que nos brinda muchos beneficios para la vida; la miel y el propóleo nos ofrece grandes resultados en la inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 y sobre todo tiene pocos efectos colaterales indeseables. Por todo lo expuesto anteriormente, el presente estudio de investigación tuvo como objetivo comparar el efecto antifúngico, entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo de *Apis mellífera* vs. extracto hidrotanólico de propóleo sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.<sup>3,4</sup>

Esta investigación es importante porque aunque existe un estudio de investigación, hasta ahora no se ha encontrado estudios que se hayan realizado en nuestro país, con el fin de saber que tanta efectividad antifúngica podrían tener al ser unidas tanto la miel con el propóleos de *Apis mellífera*. Además de ello se podrían crear en un futuro nuevos colutorios, cremas a base de productos naturales, que estén al alcance de las personas para prevenir o disminuir el avance de la enfermedad presente en la cavidad oral.<sup>7,4</sup>

El estudio fue experimental, prospectivo, transversal y analítico. La muestra estuvo conformada por 15 placas petris sembradas con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizaron 10 repeticiones de placas petris por cada concentración. La evaluación del efecto de los extractos hidroetanólico de miel y propóleo se realizaron mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar. Los discos fueron colocados sobre las placas de Müeller Hinton, durante 24 horas las placas estuvieron en posición invertida a 37°C. Se concluyó que al comparar el extracto hidroetanólico mixto con el extracto hidroetanólico del propóleo obtenemos igualdad en sus resultados.<sup>8</sup>

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Antecedentes:

**Ramírez T. et al.<sup>5</sup> (Perú-2016)** En su investigación titulada **efecto inhibitorio del extracto de propóleo sobre los microorganismos streptococcus mutans y candida albicans que colonizan la cavidad oral en pacientes adultos de la clínica odontológica, una puno – 2016**, y determinaron la acción inhibitoria del extracto etanólico de Propóleo sobre *Candida albicans*, realizando un estudio experimental, racional, de tipo prospectivo, transversal. Se procede con una adquisición de extracto etanólico de Propóleo. Los microorganismos se sometieron a diferentes porcentajes de concentrados de propóleo como son de 25%, 50%, 75%,100 %, por 24 horas para evaluar su actividad inhibitoria utilizando el método de Kirby Bauer. Obteniendo que a partir del 50% se observó un 6.95 mm, al 75% con 8.6 mm y al 100% con 11.8 mm. Concluyendo que el concentrado de propóleo a superiores porcentajes tiene mayor acción inhibitoria sobre *Cándida albicans*.<sup>5</sup>

**Noori A. et al.<sup>7</sup> (Egipto - 2012)** En su investigación titulada **Efectos sinérgicos de miel y propóleos hacia drogas multi-esistente staphylococcus aureus, escherichia coli y candida albicans aislamientos en modo individual y culturas polimicrobianas**, Investigaron la actividad antimicrobiana de la extracción con alcohol etílico de propóleo recogidos de Arabia Saudita (EEPS) y de Egipto (EEPE), y su efecto sinérgico cuando se utiliza con miel. Se cultivó *Candida albicans* (*C.albicans*) en miel 10-100% (v / v) diluida en caldo, o 0,08-1,0% (peso / volumen) EEPS y EEPE diluido en caldo. Se prepararon cuatro tipos de cultivos polimicrobianos cultivando los aislados entre sí en caldo (control) y caldo que

contenía diversas concentraciones de miel o propóleo. El crecimiento microbiano se evaluó sobre un medio de placa sólida después de 24 h de incubación.<sup>7</sup>

Los resultados; EEPS y EEPE inhibieron resistentes a los antibióticos *de C. albicans* en cultivos individuales. Cuando el propóleo se mezcló con miel, el EEPS mostró CMI más bajo que el EEPE. Se concluye; un sinergismo fuerte cuando se mezcla con miel y propóleo (esto se podría explicar a contienen flavonoides y compuestos fenólicos), este estudio pavimentará el camino a aislar los ingredientes activos de miel y propóleos para ser probados más individualmente o en combinación contra infecciones resistentes al hombre. Además, tanto la miel como los propóleos estimulan la producción de anticuerpos <sup>7</sup>

**Ojeda R.<sup>9</sup> (Chile - 2012)** En su investigación titulada **caracterización cualitativa de compuestos fenólicos en miel de diferente origen, y evaluación de actividad antibacteriana y antifúngica.** Estudió la sensibilidad de la *Candida albicans*, en mieles enteras y extractos etanólicos de mieles. Tiene como objetivo sustraer, apartar y desarrollar una prueba comparativa de los compuestos fenólicos que se derivan de las mieles de distintas procedencias y evaluar su efectividad antifúngica. Para ver su sensibilidad de realiza mediante procesos de extracción con acetato de etilo y para el monitoreo de su efectividad antimicrobiana. Se utilizaron 4 mieles de diferentes orígenes en concentraciones del 50% (p/v) y se determinó la efectividad antimicrobiana total utilizando el método de difusión en agar Mueller Hinton. Como resultados se obtuvo que ninguna de las mieles tuvieron efectividad contra cepas de hongos. En cuanto a los extractos etanólicos, no presentó actividad antifúngica. Se concluye que las fracciones de los extractos que tenían flavonoides, no son las responsables de la efectividad antibacteriana de la miel.<sup>9</sup>

**Montenegro G. et al.<sup>10</sup> (Chile - 2009)** En su investigación titulada **Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de Quillaja saponaria, especie endémica de Chile**, tuvieron como objetivo investigar las mieles monoflorales de la especie chilena Quillaja saponaria donde se detectaron los compuestos fenólicos. Estos extractos mostraron actividad antifúngica contra la levadura *Candida albicans*. En la extracción de mieles para pruebas biológicas su procedimiento fue que el extracto fue disuelto en 2mL agua tridestilada, y además se esterilizó por contrapresión en jeringas, con filtro de un diámetro de poro de 0,45µm. Se aseguró la ausencia de microorganismos en el extracto, sembrando en forma de césped, 100µL del extracto en placas de Petri con Agar - Soya tripticasa. Estas fueron puestas durante 48 horas a 37°C en cámara de crecimiento. Como resultado se obtuvo que la levadura *Candida albicans* no fue inhibida por los extractos. Concluyendo que los compuestos aislados no explican efectivamente la actividad microbiológica de la miel.<sup>10</sup>

**Noori A. et al.<sup>11</sup> (Dubai - 2014)** En su investigación titulada **efectos de la miel natural en el cultivo polimicrobiano de varios patógenos humanos**. Investigaron la actividad de la miel hacia una dosis alta de cultivo único o polimicrobiano. Se evaluó el efecto de la miel en alta dosis de cultivo único o polimicrobiano. Se cultivaron *Candida albicans* (*C. albicans*) en 10 ml de 10-100% (p / v) miel diluida en caldo. Se prepararon seis tipos de cultivos microbianos polimicrobianos cultivando los aislamientos entre sí sobre caldo (control) y caldo que contenía diversas concentraciones de miel (10-100% p / v). El crecimiento microbiano se evaluó sobre un medio de placa sólida después de 24 h de incubación. Teniendo como

resultados que la miel (30-70%) impide el crecimiento de 10 µl de especímenes de todos los aislamientos. El cultivo de *C. albicans* aumentó su sensibilidad a la miel. Se puede concluir que la miel previene e inhibe el crecimiento de cultivos patogénicos únicos y polimicrobianos.<sup>11</sup>

**Boorn K. et al.<sup>12</sup> (Australia - 2009)** En su investigación titulada **actividad antimicrobiana de la miel de la abeja sin aguijón *Trigona carbonaria* determinada por difusión en agar, dilución en agar, microdilución en caldo y metodología de eliminación temporal.** Determinaron el espectro de actividad antimicrobiana de 11 muestras de miel de abeja sin aguijón en comparación con mieles medicinales, de mesa y artificiales. Se evaluó la actividad mediante ensayos de difusión en agar, dilución en agar, microdilución en caldo y ensayos de viabilidad en el momento de la muerte. El tratamiento de microorganismos con 20% (p / v) de miel de abeja sin aguijón durante 60 min resultó en <1 log para *C. albicans*. Un tratamiento similar con cada miel de control produjo una disminución de <1 log para todos los organismos. Para concluir la miel de abeja sin aguijón tiene actividad antibacteriana de amplio espectro, aunque la actividad contra *Candida* fue limitada.<sup>12</sup>

**García A. et al.<sup>13</sup> (Venezuela - 2014)** En su investigación titulada **eliminación de *Candida albicans* con extracto etanólico de propóleo comercial de *Apis mellifera* del estado Mérida, en bases de prótesis parciales removible.** Determinaron la actividad de los EEP comerciales, para la aniquilación total de *C. albicans* en muestras de resina acrílicas duras de PDR. Se experimentaron con EEP de varias concentraciones (20%, 30%, 40%). Se hicieron dos procedimientos: la limpieza de las muestras de acrílico fueron introducidas en los EEP por 5min, 10min, 15min,

20min y 8 h, luego se hizo una propagación del agar con porcillo para evaluar los halos que inhibieron. Se presenció al inicio que en las placas Petri hubo un aumento de *C. albicans* en el control; y luego en el EEP al 20% se observó una disminución de inhibición, en los EEP al 30% y 40% originaron halos inhibitorios de modo irregular para lo cual hubo aumento de *C. albicans* desde las 24 h. Para concluir que los EEP al 20% demostraron poder inhibir el aumento de *C. albicans* y al 30% y 40% presentaron efectividad antimicótica en *C. albicans*.<sup>13</sup>

**Gil M. et al.<sup>14</sup> (Venezuela - 2015)** En su investigación titulada **efecto fungistático y fungicida del extracto etanólico de propóleos sobre especies de candida**. Determinaron el efecto fungistático y fungicida de un extracto etanólico de propóleo comercial al (70% v/v) proveniente de un apiario del Estado Cojedes Venezuela sobre especies de *C. albicans*. La metodología utilizada fue la técnica de macrodilución en tubo. El extracto de propóleo demostró efecto fungistático total a 15% sobre Complejo *Candida albicans* a 48 horas de incubación. El efecto fungicida en 24 horas fue de 11% para Complejo *C. albicans*. El efecto fungicida en 48 horas de incubación fue de 15% para Complejo *C. albicans*. Concluyendo que el extracto etanólico del propóleo tiene efecto fungistático y fungicida in vitro en la cepa Complejo *Candida albicans*.<sup>14</sup>

**Viloria J. et al.<sup>15</sup> (Colombia - 2016)** En su investigación titulada **Actividad in vitro de extractos etanólicos de propóleo del bajo cauca antioqueño sobre dos hongos filamentosos y uno levaduriforme**. Evaluaron su efectividad antimicótica in vivo en concentrados etanólicos de propóleo (EEP), derivados de muestras de apiarios científicos, de la región del Bajo Cauca antioqueño, frente a *Candida albicans*. El

propóleos se cosechó de dos diferentes maneras, por malla y raspado, en distintos meses del año. Se utilizó el método de macrodilución en caldo, se analizaron seis cantidades de EEP, entre 156 a 5000 $\mu\text{g/mL}$ -1 y se definió que concentración inhibió el 80 y el 50% del aumento de la levadura. Los resultados mostraron que al recolectar el propóleos hubieron discrepancias en el desarrollo de la cepa *C. albicans*. Concluyendo que los concentrados valorados, dos evidenciaron una inhibición del desarrollo moderada, ya que al comprar el control y la *C. albicans* demostraron mayor sensibilidad frente a los EEP analizados.<sup>15</sup>

## **2.2 Marco teórico**

### **2.2.1 Hongos sensibles**

Existen diferentes hongos que son susceptibles a la efectividad de algunos productos naturales, como son los siguientes *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida albicans*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida reukaffi*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Cándida utilis*, *Penicillium sp*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces sp*.<sup>9</sup>

#### **2.2.1.1 Candida albicans**

Son levaduras, que tienen la capacidad de crecer y reproducirse fácilmente y podemos hallarlas dentro de la microflora oral en un estado normal; están presentes en la lengua, en el paladar, en la mucosa oral, etc, son hongos gram positivos y aerobias, teniendo como medio de cultivo el agar de Sabourand a una temperatura promedio de los 20°C y los 38°C. <sup>17, 18</sup>

### **2.2.1.2 Candida albicans ATCC 10231:**

#### **2.2.1.2.1 Morfología:**

En agar YEPD después de 2 días a 25 ° C, las colonias son de color crema, brillantes y lisas. Las colonias más viejas muestran una estructura tipo filamentos en el margen y pueden tener crestas o carpetas. Las células son ovoides (3.0-6.0 x 4.0-8.0 µm), en gemación, principalmente aisladas y raramente agrupadas en cultivos jóvenes. Las células se alargarán y formarán pseudohifas ramificadas similares a cadenas en cultivos más antiguos.<sup>19</sup>

#### **2.2.1.2.2 Medios de cultivo:<sup>19</sup>**

- **Medio**

- ATCC ® Medium 200: YM agar o YM caldo
- ATCC ® Medium 28: modificación de agar de Sabouraud Emmons'
- ATCC ® Medium 1245: YEPD

- **Condiciones de crecimiento**

- Temperatura: 24 ° C a 26 ° C
- Ambiente: típico aeróbico

#### **2.2.1.2.3 Historia<sup>19</sup>**

- **Aislamiento**

- Hombre con bronquomicosis.

#### **2.2.1.3 Etiología**

Las diferentes causas que provocan dicha alteración en este hongo pueden ser la diabetes, el SIDA, el tabaquismo, la drogadicción, mujeres gestantes, la ancianidad, el

consumo de antibióticos, las radiaciones, todas estas favorecen la evolución de la enfermedad.<sup>20</sup>

#### **2.2.1.4 medio de cultivo**

Se empieza tomando una buena muestra, este debe estar apropiado conteniendo agua, sales, nitrógeno, carbono y minerales.<sup>21</sup> Para el medio de cultivo se utiliza el agar de Sabouraud, el cual contiene glucosa y peptona que vienen a ser sus elementos nutritivos, además de poseer un pH ácido.<sup>22,21</sup>

#### **2.2.2 Candidiasis oral**

Es una de las más frecuente de las infecciones micóticas bucales provocadas por Candida, está presente en rangos normales en la flora del tracto digestivo y vaginal. Un síntoma muy peculiar es la sensación de "quemazón" en la mucosa afectada. La candidiasis afecta también la mucosa oral.<sup>16</sup>

##### **2.2.2.1 Etiopatogenia**

Esta común infección ocurre por la incursión tisular, originando un estado hipersensitivo que al introducirse generan una potente toxina. Existen también otros factores predisponentes como son la malnutrición, terapias mediante antibióticos, puede presentarse trastornos sistémicos debido a un estado inmunodeficiente del organismo y en otros casos se da por factores locales como el tener una prótesis mal ajustadas.<sup>16</sup>

##### **2.2.2.2 Tratamiento**

Se recomienda utilizar para combatir esta enfermedad los antimicóticos como la nistatina, fluconazol, itraconazol y la anfotericina B, se administran por topes, por suspensiones, pastilla o intravenosa.<sup>20</sup>

### **2.2.3 Agentes antifúngicos.**

Los procedimientos de infecciones antimicóticas bucales graves son una de las terapias farmacológicas más complicadas, puesto que no existe una gran variedad de antifúngicos ni de métodos que nos ayuden a combatir contra estos hongos.<sup>22</sup>

Durante las últimas tres décadas, las infecciones por hongos se han convertido en un problema importante en todo el mundo, especialmente entre los individuos inmunocomprometidos. A pesar de que *Candida* es la causa principal de las infecciones micóticas oportunistas, hay un número limitado de antimicóticos disponibles para la terapia. Agentes antifúngicos divididos comúnmente utilizados para el tratamiento de la candidiasis en cinco grupos principales en función de su modo de acción; grupo I: inhibición de la síntesis de ARN y / o ADN (análogos de pirimidina fluorados 5-FC); grupo II: alteración de la función de la membrana (polienos: nistatina, natamicina, anfotericina B AMB); grupo III: alteración de la biosíntesis de la pared celular por inhibición de la  $\beta$  glucano sintasa (equinocandinas: caspofungina, micafungina, anidulafungina); grupo IV: inhibición de la biosíntesis de ergosterol por inhibición de la escualeno epoxidasa y / o acumulación de productos intermedios de esterol tóxicos (alilaminas: terbinafina, naftifina); y grupo V: inhibición de la lanosterol desmetilasa en la biosíntesis de ergosterol (azoles)<sup>22</sup>

#### **2.2.3.1 Nistatina**

Es un antifúngico perteneciente al grupo de los macrólidos polínicos, es utilizada para diferentes situaciones clínicas infecciones fúngicas de la piel, boca, vagina e intestinos, también se usa de manera profiláctica en pacientes con inmunodeficiencia,

diabéticos, en tratamiento con antibióticos y corticoides que estén en riesgo de ser infectados con hongos.<sup>22,23</sup>

#### **2.2.3.1.1 Mecanismo de acción**

Los polienos poseen la facilidad de juntarse debido a sus enlaces covalentes del ergosterol que constituye la membrana antimicótica; este no se haya en las células eucariotas del ser humano, por ende los antifúngicos presentan mayor selectividad, afectando de esta manera a la levadura en cuanto a su desarrollo, ya que la permeabilidad de la membrana celular de esta levadura se ve alterada provocando la salida de los componentes celulares, ocasionando la eliminación de la candida.<sup>22, 24</sup>

#### **2.2.3.1.2 Espectro antimicótico**

La Nistatina frente a infecciones por Candida ya sea en mucosa como en piel es momentánea, pero sin embargo tiene un espectro antifúngico oportuno para realizar un tratamiento de Candida albicans.<sup>24</sup>

#### **2.2.3.1.3 Indicaciones**

Está determinada como agente antimicótico con un excelente efecto en procedimientos de infecciones como la candidiasis oral y otras, cabe recalcar también que no ocasiona efectos de irritabilidad local o alérgicos, pero es tóxico si se aplica de manera sistémica es por ello el uso tópico que tiene.<sup>23</sup>

#### **2.2.3.1.4 Estructura química**

La nistatina son moléculas con dos propiedades; una región hidrofílica, que está compuesta por anillos macrólidos; y la hidrofóbica contiene un gran número de diferentes hidroxilos, enlaces covalentes simples y dobles que se encuentran alternados, es por ello que se conocen también como polienos.<sup>25</sup>

#### **2.2.3.1.5 Mecanismo de resistencia**

No es muy común que estas levaduras se resistan a los antimicóticos poliénicos, y si hubiera alguna resistencia, este sería por la selección natural de células resistentes, que se encuentran en mínimas cantidades, que es ahí donde se fijan los polienos, originando así una resistencia al efecto farmacológico.<sup>25</sup>

#### **2.2.3.1.6 Efectos adversos <sup>25</sup>**

La forma de suspensión oral produce una serie de efectos adversos que incluyen, entre otros:

- Diarrea
- Dolor abdominal
- En raras ocasiones, taquicardia, broncoespasmo, hinchazón facial, dolores musculares
- Tanto la suspensión oral como la forma tópica pueden causar:
- Reacciones de hipersensibilidad, incluido el síndrome de Stevens-Johnson en algunos casos
- Sarpullido, picazón, ardor y pustulosis exantemática generalizada aguda

#### **2.2.3.1.7 Mecanismo de acción**

Al igual que la anfotericina B y la natamicina, la nistatina se une al ergosterol, un componente principal de la membrana celular fúngica. Cuando está presente en concentraciones suficientes, forma poros en la membrana que conducen a fugas de K<sup>+</sup>, acidificación y muerte del hongo. El ergosterol no tiene efectos relevantes en animales ni en plantas. Sin embargo, muchos de los efectos sistémicos / tóxicos de la nistatina en los seres humanos son atribuibles a su unión a los esteroides de los

mamíferos, a saber, el colesterol. Este es el efecto que da cuenta de la nefrotoxicidad. Observado cuando se alcanzan altos niveles séricos de nistatina.<sup>25</sup>

#### **2.2.4 Propóleo**

El propóleo o la cola de abeja es una mezcla resinosa que producen las abejas melíferas al mezclar saliva y cera de abejas con el exudado recolectado de yemas de árboles, flujos de savia u otras fuentes botánicas. Se utiliza como sellador para espacios abiertos no deseados en la colmena. El propóleo se usa para pequeños huecos (aproximadamente 6 milímetros (0.24 pulg.) O menos), mientras que los espacios más grandes generalmente se rellenan con cera de abejas. Su color varía dependiendo de su fuente botánica, con el marrón oscuro como el más común. El propóleo es pegajoso a temperaturas superiores a 20 ° C (68 ° F), mientras que a temperaturas más bajas, se vuelve duro y quebradizo.<sup>26</sup>

Mientras recolectan alimentos, las abejas obreras recolectan principalmente polen y néctar, mientras que también recolectan el agua y la resina del árbol necesarias para la producción de propóleo. La composición química y la naturaleza de los propóleo dependen de las condiciones ambientales y los recursos cosechados.<sup>14, 25</sup>

##### **2.2.4.1 Composición**

La composición de los propóleo varía de una colmena a otra, de un distrito a otro y de una temporada a otra. Normalmente, es de color marrón oscuro, pero se puede encontrar en tonos verde, rojo, negro y blanco, dependiendo de las fuentes de resina que se encuentran en el área de la colmena en particular. Las abejas son oportunistas, ya que reúnen lo que necesitan de las fuentes disponibles, y los análisis detallados muestran que la composición química de los propóleo varía considerablemente de

una región a otra, junto con la vegetación. En los climas templados del norte, por ejemplo, las abejas recolectan resinas de los árboles, como los álamos y las coníferas. (El papel biológico de la resina en los árboles es sellar heridas y defenderse contra bacterias, hongos e insectos). El propóleo templado del norte "típico" tiene aproximadamente 50 componentes, principalmente resinas y bálsamos vegetales (50%), ceras (30%), aceites esenciales (10%) y polen (5%). El propóleos también contiene acaricidas lipófilos persistentes, un pesticida natural que disuade a las infestaciones de ácaros.<sup>26</sup>

#### **2.2.4.2 Uso en las abejas:**

Es utilizado para tapizar el interior de las celdillas y cámaras de cría, las sellan para evitar su contaminación; refuerzan cualquier estructura inestable; sellan las grietas evitando que se formen corrientes de aire; reducen al mínimo las piqueras de entrada a las colmenas para evitar el ingreso de depredadores que podrían ser momificados. Con el propóleos amortiguar los sonidos intensos ya que las abejas son muy sensibles a ellos; mantienen estable la temperatura de la colmena (alrededor de 30°C), el nivel de humedad evitando la evaporación excesiva de esta, ya que las larvas la necesitan para su desarrollo.<sup>26</sup>

#### **2.2.4.3 Propiedades físicas del propóleo.**

El color de los propóleos varía según el área y la fuente de la planta. Se derrite de 60 ° C a 70 ° C, mientras que algunos de sus tipos se funden a 100 ° C. Duro a bajo y suave a alta temperatura. Se extrae comercialmente con solventes adecuados, es decir, etanol, metanol, cloroformo, éter y acetona. Se encuentra comercialmente en forma de dentífricos, pastillas, enjuagues bucales, cremas, geles, jarabes para la tos, vino,

pastel, polvo, jabón, chicles y tabletas así como caramelos, champús, barras de chocolate, lociones para la piel, pastas de dientes mezclas antisépticas y También se utiliza para la preservación de la carne.<sup>27</sup>

#### **2.2.4.4 Actividad y propiedades biológicas**

Por su acción antiinflamatoria el propóleo, aumenta la capacidad del sistema inmune, estimula la eliminación de residuos tóxicos, actúa frente a microbios y virus, es antimicóticos, anestésicos, y además cicatrizante, antioxidantes y anticariogénicas, por todo ello es que ha originado un gran interés en la medicina y en la industria farmacéutica.<sup>26</sup>

#### **2.2.4.5 Características físico químicas**

El propóleo puede presentar una consistencia dura o blanda, del mismo modo el color varía desde un marrón oscuro a un marrón claro con tintes amarillos o con tintes castaños; el sabor puede ser picante, dulce o amargo, todo esto es según el clima y la zona donde se ubica la colmena.<sup>26</sup>

#### **2.2.4.6 Mecanismo de acción**

Al estar unidos sus componentes, provocan que la bacteria pierda su capacidad de motilidad y transporte de la membrana, quedando así susceptible a los efectos del propóleo, al ataque inmunológico y a los potentes antibióticos.<sup>28,29</sup>

#### **2.2.4.7 Dosis**

El propóleo para su uso oral deber ser de 5 mg por kg de peso al día, y para uso externo se deja al criterio del gusto de cada persona.<sup>30</sup>

#### **2.2.4.8 Efectos adversos**

Las reacciones adversas ya sean por vía tópica, oral o local de la administración del propóleo son casi escasas o nulas, por lo general podría provocar reacciones alérgicas de hipersensibilidad en la piel.<sup>28</sup>

#### **2.2.4.9 Usos en odontología**

Dentro de la odontología el propóleo ha sido aprovechado en la fabricación de colutorios y cremas (como cicatrizantes), recomendada en pacientes con enfermedades de gingivitis, Alveolitis post extracción, estomatitis subprotésica.<sup>13</sup>

#### **2.2.5 Miel de abeja**

La miel es una sustancia alimenticia dulce y viscosa producida por las abejas y algunos insectos relacionados. Las abejas producen miel a partir de las secreciones azucaradas de las plantas (néctar floral) o de las secreciones de otros insectos como la mielada. Lo hacen por regurgitación, actividad enzimática y evaporación de agua. La miel se almacena en estructuras de cera llamadas panales. La variedad de miel producida por las abejas (el género *Apis*) es la más conocida, debido a su producción comercial mundial y consumo humano. La miel se recolecta de colonias de abejas silvestres, o de colmenas de abejas domesticadas, una práctica conocida como apicultura.<sup>9</sup>

##### **2.2.5.1 Formación**

La miel es producida por las abejas que recogen el néctar para su uso como azúcares consumidos para apoyar el metabolismo de la actividad muscular durante el forrajeo o para ser almacenada como un suministro de alimentos a largo plazo. Durante el forrajeo, las abejas acceden a una parte del néctar recolectado para apoyar la actividad

metabólica de los músculos del vuelo, y la mayoría del néctar recolectado está destinado a la regurgitación, digestión y almacenamiento como miel. En clima frío o cuando escasean otras fuentes de alimentos, las abejas adultas y larvales utilizan la miel almacenada como alimento.<sup>9</sup>

#### **2.2.5.2 Propiedades físicas y químicas**

Las propiedades físicas de la miel varían, dependiendo del contenido de agua, el tipo de flora utilizada para producirla (pastos), la temperatura y la proporción de los azúcares específicos que contiene. La miel fresca es un líquido súper saturado, que contiene más azúcar que el agua que normalmente se puede disolver a temperaturas ambiente. A temperatura ambiente, la miel es un líquido sobre enfriado en el que la glucosa se precipita en gránulos sólidos. Esto forma una solución semisólida de cristales de glucosa precipitados en una solución de fructosa y otros ingredientes.<sup>9</sup>

#### **2.2.5.3 Uso Médico**

Heridas y quemaduras: Algunas evidencias muestran que la miel esterilizada puede ayudar a curar las heridas de la piel después de la cirugía y las quemaduras leves (de espesor parcial) cuando se usa en un apósito, pero en general, la evidencia del uso de la miel en el tratamiento de heridas es de una calidad tan baja que las conclusiones firmes no pueden ser dibujado. La evidencia no respalda el uso de productos a base de miel en el tratamiento de úlceras por estasis venosa o uñas encarnadas.<sup>9</sup>

#### **2.2.6 Fitoterapia**

Es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con fines terapéuticos, ya sea para prevenir, atenuar o curar alguna patología. Las plantas han sido utilizadas desde tiempos antiguos para el tratamiento de enfermedades, las

mismas que presentan efectos fisiológicos múltiples debido a la presencia de más de un principio activo.<sup>29, 30.</sup>

#### **2.2.6.1 Plantas medicinales aromáticas**

Son vegetales aromáticos considerados como recurso ya que en sus órganos poseen sustancias que son usadas terapéuticamente ya sea para prevenir o para curar enfermedades y de esta manera reestablecer la salud perdida.<sup>31</sup>

### **III. HIPÓTESIS:**

El extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo de *Apis mellifera*, tiene mayor efectividad antifúngica que el extracto hidroetanólico de propóleo sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

### **IV. METODOLOGÍA:**

#### **4.1 Diseño de la investigación:**

-**Experimental:** Porque se manipulará la variable independiente<sup>32</sup> (los extractos hidroetanólicos de miel, propóleo y mixto) para así poder observar sus efectos antifúngicos sobre la variable dependiente (*Candida albicans*) mediante un control.

- **Transversal:** Porque se realizará observaciones en un momento único en el tiempo dentro del estudio.<sup>32</sup>

- **Prospectivo:** Porque se midió el efecto antifúngico sobre variable dependiente (*Candida albicans*) cuando se inicie el estudio.<sup>32</sup>

- **Analítico:** Porque consiste en la desmembración de un todo, descomponiéndolo en sus partes o elementos para observar las causas, la naturaleza y los efectos.<sup>32</sup>

#### 4.2 Población y muestra:

**Población:** cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

##### **Criterios de selección:**

- **Criterios de Inclusión:**

- Placas sembradas con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

- **Criterios de exclusión:**

- Placas con halos de inhibición no claro.

- Placas de *Candida* con signos de contaminación.

- Placas de *Candida* obsoletas de reestablecerse en el medio de cultivo.

##### **Muestra:**

##### **Tamaño de Muestra:**

La muestra para el presente estudio es

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2s^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ ; para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

$Z_{\beta} = 0.84$ ; para una potencia de prueba de  $\beta = 0.20$

$S = 0.8 (\mu_1 - \mu_2)$  el cual es un valor asumido por no haber estudios similares.

Luego Reemplazando obtenemos  $n = 10$  repeticiones

Luego la muestra estará conformada por  $n = 10$  repeticiones de placas petris por cada tratamiento.

Se usaron 10 placas por cada grupo experimental.

### 4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	VALOR FINAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION
<b>Variable independiente</b>  EXTRACTO HIDROETANOLICO	Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, usando un solvente como etanol y agua destilada. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo.	Sustancias que se obtendrán a partir de los protocolos establecidos a base de miel y propóleo maceradas en una sustancia hidroetanólica la cual será utilizada para comprobar y comparar el efecto antifúngica frente a cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Rótulo del extracto	Miel 40%  Propóleo 40%  Miel con propóleo 40%	Cualitativo	Nominal
<b>Variable dependiente:</b>  EFECTO ANTIFUNGICO SOBRE CANDIDA ALBICANS	Es un hongo microscópico, normalmente inofensivo, que se encuentra en nuestro organismo sin efectos patológicos, al nivel de los genitales, tracto digestivo, boca y piel. En algunos casos, puede llegar a ser patógena y causar candidiasis, una infección micótica causada por el mismo microorganismo, que ataca principalmente a los organismos frágiles con las defensas inmunitarias bajas.	Sensibilidad del patógeno oral usando el método de Kirby Bauer.	Halos de inhibición	mm	Cuantitativo	De Razón

## **4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

**4.4.1. Técnica:** Observación microbiológica.

### **4.4.2. Instrumentos:**

- Ficha de recolección de datos. (Anexo 1)
- Para medir el efecto antifúngico se utilizó una regla Mitutoyo Digital Vernier Caliper 0-150mm/0.01mm métrico/pulgada, 500-196-30 con ISO de calidad 17025. (Anexo 2)

### **4.4.3 Procedimiento:**

#### **a) Recolección del material biológico.**

##### **Recolección de la muestra de propóleo y miel:**

El propóleo y la miel han sido obtenidos de la localidad de Huangamarca distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, región La Libertad.

La recolección del propóleo fue realizada mediante el método de entrampado, ya que nos ofrece mejor calidad y menos contaminación de la muestra. Luego el propóleos se colocó en frasco de vidrio estéril.<sup>33</sup>

El transporte del propóleo y de la miel se realizó en un cooler y se llevaron al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.<sup>33</sup>

**b) Preparación del extracto hidroetanólico de propóleo:**

Para la preparación del extracto se contó con la colaboración de la Dra. Marilú Soto Vásquez, especialista en Farmacia y Bioquímica. (Anexo 3)

Antes de preparar el extracto hidroetanólico, se procedió a eliminar las impurezas visibles que se encuentren en el propóleo, tales como virutas de madera, partes de abejas, restos vegetales.<sup>33</sup>

La muestra de propóleo en bruto fue fraccionada en trozos de 2 cm aproximadamente y fue colocada en refrigeración a 0 °C por 24 horas para solidificarla. Luego, se trituró los trozos en un mortero y se pasó a través del tamiz # 20.<sup>32</sup>

Se pesaron 50 g de propóleo en polvo tamizado, y se colocaron en un balón de fondo plano de 1 litro de capacidad. Luego se agregó 500 ml de etanol al 30% y se llevó a reflujo por espacio de 2 horas. Pasando el tiempo se realizó la filtración al vacío con un papel filtro Whatman N° 2 y se concentró el extracto en un rota vapor a presión reducida a una temperatura de 40° C. El extracto obtenido se sometió a secado en estufa a 40 °C durante 2 horas, para obtener el denominado extracto blando total. A partir de este extracto se preparó la concentración de 40 %, disueltos en etanol de 30 %. La concentración se colocó en un frasco estéril de cristal de color ámbar y fue llevado a congelar a 4°C para luego ser evaluado microbiológicamente.<sup>33</sup>

**c) Preparación del extracto hidroetanólico de la miel:**

Se midió el volumen de 40 mL de miel y se colocó en un matraz de 250 mL. Luego se añadió en el matraz 80 mL, 70 mL y 60 mL de etanol al 30% respectivamente. Luego se llevó a agitación por 1 hora. Pasando el tiempo se realizó la filtración al vacío con un papel filtro Whatman N° 2. La concentración fue colocada en un frasco

estéril de cristal de color ámbar y fue llevada a congelar a 4°C para luego ser evaluado microbiológicamente.<sup>34</sup>

**d) Preparación de las concentraciones del extracto hidroetanólico de miel y propóleo:**

A partir del extracto hidroetanólico de miel y propóleo obtenido se procedió a preparar la concentración que fue empleada en la investigación, como sigue:

Extracto hidroetanólico de miel de 40 % v/v

Extracto hidroetanólico de propóleo de 40 % v/v.

**e) Preparación de la mezcla de los extractos hidroetanólicos de propóleo y miel:**

El extracto hidroetanólico de propóleo y miel de la concentración de 40%, se mezcló en proporciones de 1:1.

**Protocolos microbiológicos:**

Evaluación del efecto del extracto hidroetanólico de miel y propóleo de *Apis mellífera* sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

Se contó con la colaboración de la Dra. Manuela Lujan Velásquez, Bióloga y Microbióloga de la escuela de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo (Anexo 4).

Antes del procedimiento microbiológico se compró la cepa de *Candida albicans* (Anexo 4) y Sabouraud Dextrose Agar 500 g (Anexo 5).

### **1. Reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231:**

Para este estudio se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *Candida albicans* 10231.

La reactivación se realizó sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Sabouraud, luego se incubó a 37°C por 24 horas.

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar Sabouraud e incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó coloración gram.

La cepa se mantuvo en caldo BHI y en Agar Sabouraud, hasta que se utilizó.<sup>34</sup>

### **2. Método de difusión en agar:**

La evaluación del efecto de los extractos hidroetanólico de miel y propóleo se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar <sup>35</sup>. Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

### **3. Estandarización del inóculo de *C. albicans* ATCC 10231:**

Las cepas de *C. albicans* ATCC 10231 mantenidos en Caldo BHI y Agar Sabouraud se sembraron en Agar Sabouraud, e incubaron a 37°C durante 24 horas, para obtener colonias jóvenes.

Luego, de 24 horas cada colonia de *C. albicans* ATCC 10231 se colocó en caldo BHI y se hicieron suspensiones con una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  bact./mL)<sup>35</sup>.

#### **4. Inoculación:**

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo ( $1.5 \times 10^8$  bact/ml), se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l y se colocó en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton suplementado con 2 % de glucosa (AMHG), con un hisopo estéril se sumergió en la suspensión, se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una repartición por igual del inóculo en la placa. Se decidió secar la placa a temperatura ambiente por 3 a 5 minutos para que no queden partículas de agua.<sup>8</sup>

#### **5. Preparación de los discos con el extracto etanólico de miel y propóleo de *Apis mellífera*:**

Se preparó discos de papel filtro whatman número 3 aséptico, que fueron empapados con 30  $\mu$ l en la concentración de 40 %, del extracto hidroetanólico de miel, 40% de extracto hidroetanólico de propóleo. Luego, con una pinza de algodón aséptica, se llevaron los discos sobre las placas de Müeller Hinton (AMHG) inoculadas con la *C. albicans* ATCC 10231.<sup>8</sup>

#### **6. Incubación:**

Se incubaron las placas Petri en forma invertida durante los 15 minutos posteriores del agregado de sustancias a determinar, a 37°C durante 24 horas.<sup>8</sup>

#### **7. Lectura de los resultados:**

Pasado del tiempo de incubación de 24 horas se examinó cada placa Petri y se midieron los diámetros de los halos de inhibición (mm) del crecimiento alrededor de

cada disco. Para lo cual se utilizó una regla milimetrada Mitutoyo Digital Vernier, abarcando el diámetro del halo.<sup>8</sup>

#### **4.5 Plan de análisis**

Los datos obtenidos fueron incorporados en el programa IBM SPSS Statistics versión 23 trabajándose con la prueba estadística ANOVA, t de student y la prueba de post hoc Duncan. Los datos fueron organizados y presentados en tablas y estadísticos para su análisis e interpretación, considerando un nivel de significancia de 0.05.

Se contó con el apoyo de una hoja de cálculo de Microsoft Excel

#### 4.6 Matriz de consistencia

Título	Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Población
COMPARAR EL EFECTO ANTIFÚNGICO, DEL EXTRACTO HIDROETANÓLICO MIXTO DE MIEL CON PROPÓLEO DE <i>Apis mellífera</i> vs. EXTRACTO HIDROETANOLICO DE PROPOLEO SOBRE CEPAS DE <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, TRUJILLO - 2018.	¿Cuál es la diferencia del efecto antifúngico, entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo de <i>Apis mellífera</i> , contra el extracto hidroetanólico de propóleos sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	<p><b>Objetivo General:</b></p> <p>Comparar el efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, TRUJILLO - 2018.</p> <p><b>Objetivos Específicos:</b></p> <p>Evaluar el efecto antifúngico de extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, TRUJILLO - 2018.</p> <p>Evaluar el efecto antifúngico de extracto hidroetanólico de miel de sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, TRUJILLO - 2018.</p> <p>Evaluar el efecto antifúngico de extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 1031, TRUJILLO - 2018.</p> <p>Comparar el efecto antifúngico de extracto hidroetanólico mixto de miel con propóleo y Nistatina sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231, TRUJILLO - 2018.</p>	El extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo de <i>Apis mellífera</i> , tiene mayor efectividad antifúngica que el extracto hidroetanólico de propóleo sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	- Extracto hidroetanólico.  - Efecto antifúngico sobre <i>Candida albicans</i> .	<p><b>Población:</b></p> <p>Placas petris conteniendo el microorganismo de prueba.</p> <p><b>Muestra:</b></p> <p>La muestra estuvo conformada por n = 10 repeticiones de placas petris para cada concentración.</p>

#### **4.7 PRINCIPIOS ÉTICOS**

El presente estudio de investigación es un estudio in vitro que se realizó en placas de Petri, los cultivos micóticos utilizados en la investigación fueron tratados en autoclave (método físico de eliminación de microorganismos) antes de ser eliminados como residuos biocontaminados.

La investigación respeta los principios detallados en el código de ética considerados por la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote.

#### **V. RESULTADOS**

## 5.1 Resultados

**Tabla 1**

*Evaluación del efecto antifúngico de extracto hidroetanólico de propóleo, extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo, extracto hidroetanólico de miel, etanol y nistatina sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231.*

Concentración	N	Media	Desviación típica	95% del intervalo de confianza para la media		P* ANOVA
				Límite inferior	Límite superior	
Propóleo 40%	10	18,2000	1,22927	17,3206	19,0794	0,00
Propóleo 40% + miel 40 %	10	18,5000	,84984	17,8921	19,1079	
Miel 40%	10	,0000	,0000	,0000	,0000	
etanol	10	,0000	,00000	,0000	,0000	
nistatina	10	27,2000	1,03280	26,4612	27,9388	
total	50	21,3000	4,36404	19,6704	22,9296	

*Fuente: datos proporcionados por el investigador.*

Al aplicar la prueba de ANOVA se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos de concentración con un nivel de significancia estadística ( $p < 0.05$ )

**Tabla 2**

*Comparación del efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231.*

<b>Duncan</b>		Subconjunto para alfa = 0.05		
<b>Grupos</b>	N	1	2	3
<b>Miel</b>	10	,0000		
<b>Etanol</b>	10	,0000		
<b>Miel + propóleo 40%</b>	10		18,2000	
<b>Propóleo 40%</b>	10		18,5000	
<b>Nistatina</b>	10			27,2000
<b>Sig.</b>		1,000	,528	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Podemos indicar que la prueba de Duncan, se obtuvo 3 columnas en donde están los subconjuntos y en las filas están los extractos hidroetanólicos de miel; propóleo al 40%; miel + propóleo al 40%; etanol y Nistatina.

En la columna 1 las medias de los datos de miel y etanol son iguales ya que no hay una significancia estadística entre ellos; con respecto a la columna 2 y 3 indica que las medias presentan una diferencia significativa

En la columna 2 las medias de los datos de miel + propóleo 40% son iguales ya que no hay una significancia estadística entre ellos; con respecto a la columna 1 y 3 indica que las medias presentan una diferencia significativa

En la columna 3 la nistatina con respecto a la columna 1 y 2 indica que las medias presentan una diferencia significativa.

**Tabla 3**

*Comparación del efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231.*

Concentración	N	Media	Desviación típica	95% del intervalo de confianza para la media		t	P*
				Límite inferior	Límite superior		
<b>Miel + propóleo 40 %</b>	10	18,5000	,84984	17,8921	19,1079		
<b>Propóleo 40%</b>	10	18,2000	1,22927	17,3206	19,0794	-,635	,534
<b>Total</b>	20	18,3500	1,03999	17,8633	18,8367		

*Fuente: datos proporcionados por el investigador.*

P\* prueba t de student.

Nivel de significancia estadística (p <0.05)

Se comparó el efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo de *Apis mellífera* vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Para el extracto hidroetanólico mixto de miel con propóleo se obtuvo una medida media de 18.50 mm y el extracto hidroetanólico de propóleo una medida media de 18.20 mm. No se encontró diferencia estadística significativa entre los dos grupos de concentración con un nivel de significancia estadística (p <0.05)

## 5.2 Análisis de resultados

En el presente estudio se compararon dos productos derivados de la producción de las abejas contra uno de los mayores microorganismos patógenos oportunistas de la cavidad oral, como lo es *Candida albicans*, teniendo en cuenta que ya se ha demostrado que es resistente a tratamientos farmacológicos convencionales, originando por tal motivo alternativas naturales como terapéutica.<sup>4</sup>

Existen varios estudios publicados donde se demuestra que el propóleo y miel de abeja *Apis mellifera*, tienen diferentes propiedades curativas y entre ellas una actividad antifúngica.<sup>7</sup> Sin embargo, hasta el momento no se ha encontrado ningún estudio en nuestro país, que haya sido efectuado para evaluar la actividad antifúngica de propóleo y miel juntos frente a *Candida albicans*.

En este trabajo de investigación se comparó el efecto antifúngico, de extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo de *Apis mellifera* vs. el extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, obteniendo de esta manera una efectividad antifúngica en el extracto mixto, similar a la actividad que genera el propóleo por sí solo. En el extracto mixto obtenemos efectividad por el propóleo más no por la miel, esto discrepa con el estudio de Noori A. et al.<sup>7</sup> que también determinaron la actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, ellos obtuvieron efectividad antimicótica en el grupo de la miel; esta diferencia puede ser ya que la miel que es utilizada en ambos estudios, proviene de diferentes países y por ende repercute en su vegetación de la abeja.

Determinamos la actividad antifúngica, de extracto hidroetanólico de propóleo de *Apis mellifera* al 40% sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231, encontrando

como resultado una actividad antimicótica sobre esta levadura; teniendo correlación con el estudio realizado por García A. et al.<sup>13</sup>, quienes obtienen mejores resultados frente a *C. albicans*; esto puede deberse a su estructura química, a las diferentes regiones geográficas; la época en la que se recolectó el propóleo, ya que para nuestra investigación recolectamos el propóleo en tiempo de cosecha en los meses de Julio, todo ello influye también en sus propiedades, e incluso la especie de abeja<sup>7,13,14,15</sup>. Por otra parte obtuvimos una actividad fungicida pasado las 24 horas, sin embargo en el estudio de Gil M. et al.<sup>14</sup>, la cual obtuvieron efecto fungicida pasado las 48 horas sobre la cepa *Candida albicans*. Cabe recalcar que el presente estudio se diferencia ya que se utilizó un propóleo que no fue comercial, a comparación del otro estudio; en el presente estudio se utilizó el método de Kirby Bauer y se incubó a 37 °C y diferencia de Gil M. et al.<sup>14</sup>, que utilizaron el método de macrodilución en tubos e incubaron a los 25°C.

El presente estudio mostró que el extracto hidroetanólico de miel de *Apis mellifera* no presenta actividad antifúngica contra la levadura *Candida albicans*. Por lo tanto al revisar varios estudios de investigación de diferentes autores; encontramos una igualdad en los resultados, esto posiblemente es por la utilización de acetato de etilo en su estudio de Ojeda. R<sup>9</sup> y agua tridestilada en Montero. G. et al.<sup>10</sup> y para la disolución de nuestra miel utilizamos agua destilada. Cabe mencionar que en otros estudios de varios autores realizados por Noori A. et al.<sup>11</sup>; Boorn K y col.<sup>12</sup> lograron una efectividad antimicótica limitada. Por lo consiguiente se puede concluir que la actividad antifúngica del extracto hidroetanólico de miel es nula, teniendo como referencia diferentes estudios aprobados que tienen relación con nuestra investigación.

## **V. CONCLUSIONES**

- El extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo al 40% tiene igual efecto antifúngico sobre *Candida albicans* ATCC 10231, que el extracto hidroetanólico puro de propóleo. Sin embargo, la nistatina supera su efecto.
- El extracto hidroetanólico de miel de *Apis mellífera* al 40%, no tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

## **ASPECTOS COMPLEMENTARIOS**

- Se debe realizar varios estudios sobre el extracto hidroetanólico de miel frente a otros microorganismos, ya que en la actualidad, el principal uso medicinal de la miel es en el tratamiento de heridas y quemaduras y hay varios productos disponibles en el mercado que ya se comercializan específicamente para estos usos.
- Se sugiere realizar estudios de investigación de la composición química del propóleo de la sierra Liberteña.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rueda F y Hernández S. Prevalencia de *Cándida albicans* aislada de la cavidad oral de pacientes con cáncer. Rev. Odontológica Latinoamérica [serie en internet]. 2008 [citada 01 Mayo 2017]; 10(2): [alrededor de 10 pantallas]. Disponible en: <http://www.odontologia.uady.mx/revistas/rol/pdf/V00N2p38.pdf>
2. Célis G, Guilarte C, Cardozo E. Detección de *cándida albicans* en pacientes con candidiasis pseudomembranosa. Rev. de Odontología da Universida de Cidade de São Paulo [serie en internet]. 2008 [citada 01 Mayo 2017]; 20(3): [alrededor de 5 pantallas]. Disponible en: [http://arquivos.cruzeirosuleducacional.edu.br/principal/old/revista\\_odontologia/pdf/setembro\\_dezembro\\_2008/unicid\\_20\\_3\\_2008.pdf#page=6](http://arquivos.cruzeirosuleducacional.edu.br/principal/old/revista_odontologia/pdf/setembro_dezembro_2008/unicid_20_3_2008.pdf#page=6)
3. Chamba L. Efecto antifúngico del aceite esencial del *origanum vulgare* (orégano) y *cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *cándida albicans* en comparación con la nistatina estudio in vitro [Tesis para obtener el título de cirujano dentista] Universidad Central del Ecuador. Ecuador: Quito, 2015. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3538/1/T-UCE-0015-93.pdf>
4. Puga D. Actividad anti fúngica: estudio microbiológico comparativo entre ajoeno y el aceite esencial de hierba luisa al 100% sobre cepas de *cándida albicans* [Tesis para obtener el título de cirujano dentista] Universidad Central del Ecuador. Ecuador: Quito, 2015. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/5330/1/T-UCE-0015-197.pdf>
5. Ramírez T y Vilcapaza M. Efecto Inhibitorio Del Extracto De Propóleo Sobre Los Microorganismos *Streptococcus mutans* Y *Cándida albicans* Que Colonizan La Cavidad Oral En Pacientes Adultos De La Clínica Odontológica, UNA PUNO –

2016. UNAP [serie en internet]. 2016 [citada 30 abril 2017]. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2987/ARTICULO.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
6. Guzmán M. Aplicación Del Propomiel En El Tratamiento De La Estomatitis Subprótesis. Facultad De Estomatología. 2011 – 2012. Rev. Universidad de Ciencias Médicas de la Habana [serie en internet]. 2012 [citado 08 Setiembre 2017]. Disponible en: <http://www.estomatologia2015.sld.cu/index.php/estomatologia/nov2015/paper/viewFile/977/334>
  7. Noori A. Ahmad A. Mohammad J, Attal Y and Khelod S. Synergistic Effects of Honey and Propolis toward Drug Multi-Resistant Staphylococcus Aureus, Escherichia Coli and Candida Albicans Isolates in Single and Polymicrobial Cultures. Int J Med Sci [serie en internet]. 2012 [citado 08 de Setiembre 2017]; 9 (9): 793 - 800. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3491439/>
  8. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute); M100-S23. 2013. Vol 33 (1).
  9. Ojeda R. “Caracterización cualitativa de compuestos fenólicos en miel de diferente origen, y evaluación de actividad antibacteriana y antifúngica” [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico] Universidad Austral de Chile. Chile: Valdivia, 2012. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fco.39c/doc/fco.39c.pdf>
  10. Montenegro G, Salas F, Peña R, Pizarro R. Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de Quillaja saponaria, especie endémica de Chile. Revista

Odontológica SCIELO [serie en Internet]. 2009 [citada 07 de Set del 2017]; 78 (2).  
Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-56572009000200010](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572009000200010)

11. Noori A. Faiza A. Mohammed A. Amjet A. Khelod S y Ahmad A. Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens. Arch Med Sci [serie en internet]. 2014 [citada 07 de Set del 2017]; 10 (2): 246 – 250. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4042029/>
12. Boorn K. Khor Y. Sweetman E. Tan F. Heard T and Hammer K. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. [serie en internet]. 2009 [citada 07 de Set del 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2009.04552.x/full>
13. Garcia A, Ucar A, Ballester L. Eliminación de *Candida albicans* con extracto etanólico de propóleo comercial de *Apis mellifera* del estado Mérida, en bases de prótesis parciales Removibles. Revista Odontológica de Los Andes [serie en internet]. 2014 [citada 30 abril 2017]; 9(2), 4-14. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/39992/1/articulo1.pdf>
14. Gil M. Joya M. Gonzales L. Figueroa Z y Perozo E. Efecto fungistático y fungicida del extracto etanólico de propóleos sobre especies de *Candida*. Universidad de Carabobo [serie en internet]. 2013 [citada 30 abril 2017]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Marielsa\\_Gil/publication/275334015\\_EFECTO\\_FUNGISTATICO\\_Y\\_FUNGICIDA\\_DEL\\_EXTRACTO\\_ETANOLICO\\_DE\\_PROPÓLEOS SOBRE ESPECIES DE CANDIDA/links/5537be0f0cf2239f4e774](https://www.researchgate.net/profile/Marielsa_Gil/publication/275334015_EFECTO_FUNGISTATICO_Y_FUNGICIDA_DEL_EXTRACTO_ETANOLICO_DE_PROPÓLEOS SOBRE ESPECIES DE CANDIDA/links/5537be0f0cf2239f4e774)

b69/EFECTO-FUNGISTATICO-Y-FUNGICIDA-DEL-EXTRACTO-  
ETANOLICO-DE-PROPOLEOS-SOBRE-ESPECIES-DE-CANDIDA.pdf

15. Viloria J. Gil J. Durango D. Marín J y Correa G. Actividad In Vitro De Extractos Etanólicos De Propóleos Del Bajo Cauca Antioqueño Sobre Dos Hongos Filamentosos Y Uno Levaduriforme. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient [serie en internet]. 2016 [citada 30 Abril 2017]; 19(2): 333-340. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v19n2/v19n2a10.pdf>
16. Polsigua T. Antibioticoterapia en el manejo de las patologías de los tejidos blandos de la cavidad bucal. [Tesis bachillerato] Ecuador: Universidad de Guayaquil; 2014. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/5263/1/POSLIGUAteresa.pdf>
17. García K. Efecto antibacteriano de una infusión de Camellia sinensis (té verde) usada como colutorio sobre placa bacteriana y saliva. Rev. Pueblo cont. [Serie en internet]. 2013 [citada 07 mayo 2017]; 24(2): 349-356. Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/51/50>
18. Negroni, M. Microbiología Estomatológica. 2da ed. Buenos Aires: Ed. Medica panamericana; 2009.
19. Robin. Candida albicans. Berkhout (10231). The essentials of life science research. [Serie en internet]. [Citado 25 Octubre 2017]. Disponible en: [https://www.atcc.org/en/Standards/Quality\\_Control\\_Strains/Pharmaceutical\\_and\\_Personal\\_Care/10231.aspx#generalinformation](https://www.atcc.org/en/Standards/Quality_Control_Strains/Pharmaceutical_and_Personal_Care/10231.aspx#generalinformation)
20. Marsh P. Microbiología oral. 5ta edición. Venezuela: editorial AMOLCA; 2011.
21. Espinosa M. Farmacología y terapéutica en odontología fundamentos y guía práctica Mexico: Médica Panamericana; 2012.

22. Liébana U. Microbiología oral. 2da ed. España: Editorial Mc Graw Hill; 1995
23. Gennaro A, Manderosian A, Hanson G, Medwick T, Popovich N, Schnaare R, et al. Remington Farmacia. Editorial. 202nd ed. Buenos Aires. : Médica Panamericana; 2000
24. Samaniego, E. fundamentos de farmacología médica. (VII Edición). Quito-Universitaria; 2010.
25. Farré R, Frasset I, Sánchez A. El propolis y la salud. Ars Pharmaceutica. [serie en internet]. 2004 [citada 30 abril 2017]; 45(1):21-43. Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/28176/1/Ars%20Pharm%202004%3b45%281%2921-43.pdf>
26. Premoli G, Laguado P, Diaz N, Romero C, Villareal J, Gonzales A. Uso del propóleos en Odontología. Rev. Odontológica Venezolana [serie en internet]. 2009 [citada 7 mayo 2017]; 48 (2): 1-13. Disponible en: <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art-23/>
27. Chaillou L. Estudio del propóleos de Santiago del estereo, Argentina. Cienc tecnol. Aliment campinas. [Serie en internet]. 2004 [citada 30 abril 2017]; 24(1): 011- 015. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612004000100003&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612004000100003&script=sci_arttext&tlng=es)
28. Vallejo V. Evaluación Antibacteriana In Vitro Del Extracto Etanólico De Propóleos Ecuatoriano al 10, 20 Y 30 %, En colonizadores primarios del Biofilm Dental. 2015. [Tesis], Universidad Central del Ecuador; 2015. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/5333/1/T-UCE-0015-203.pdf>
29. Angulo J. Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de chimborazo utilizados en la empresa apicare - riobamba.

[Tesis bachillerato]. Riobamba-Ecuador: escuela superior politécnica de Chimborazo; 2014. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3188/1/56T00426.pdf>

30. Fonegra F y Ramírez J. Plantas Medicinales aprobadas en Colombia (Segunda Edición ed.). Colombia: Editorial Universitaria de Antioquia; 2007. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=K8eI-7ZeFpsC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Fonegra,+R.+\(2007\).+Plantas+Medicinal+es+aprobadas+en+Colombia+\(Segunda+Edici%C3%B3n+ed.\).+Colombia:+Editorial+Universitaria+de+Antioquia.&ots=6DA2y6pUbu&sig=ooHnMMOwMhL3JQUJjO3321tNO3A#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=K8eI-7ZeFpsC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Fonegra,+R.+(2007).+Plantas+Medicinal+es+aprobadas+en+Colombia+(Segunda+Edici%C3%B3n+ed.).+Colombia:+Editorial+Universitaria+de+Antioquia.&ots=6DA2y6pUbu&sig=ooHnMMOwMhL3JQUJjO3321tNO3A#v=onepage&q&f=false)
31. Muñoz, F. Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio, Cultivo y Procesado. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa; 2002. Disponible en: [https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WmX5TibuSrIC&oi=fnd&pg=PA15&dq=Munoz,+F.+\(2002\).+Plantas+Medicinales+y+Arom%C3%A1ticas.+Estudio,+Cultivo+y+Procesado.+Madrid,+Espa%C3%B1a:+Ediciones+Mundi-Prensa.&ots=55aeP5fL5&sig=6T39KvWVu4mZScTYG0xdJ3mVW6c#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=WmX5TibuSrIC&oi=fnd&pg=PA15&dq=Munoz,+F.+(2002).+Plantas+Medicinales+y+Arom%C3%A1ticas.+Estudio,+Cultivo+y+Procesado.+Madrid,+Espa%C3%B1a:+Ediciones+Mundi-Prensa.&ots=55aeP5fL5&sig=6T39KvWVu4mZScTYG0xdJ3mVW6c#v=onepage&q&f=false)
32. Hernández R, Fernández C y Baptista P. Metodología de la investigación McGraw-Hill, 2014.
33. Soto-Vásquez MR. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. In Crescendo. Institucional. 2015; 6(2): 22-32.

34. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43:1-2; 43:1-2; 187-204, 2002.
35. Adrianzén J. y García V. Efecto *in vitro* de la miel de *Apis mellífera* frente a *Escherichia coli* y *Cándida albicans*. Tesis para obtener grado académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Trujillo, Perú. 2017.
36. Cantón L.E; Martín M.; Espinel-Ingroff .A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. 2007. Revista Iberoamericana de Micología - ISBN: 978-84-611-8776-8



## Anexo 2

Regla Mitutoyo Digital Vernier Caliper 0-150mm/0.01mm métrico/pulgada, 500 - 196-30 con ISO de calidad 17025.



### Anexo 3

*Constancia de colaboración de Marilú Roxana Soto Vásquez Dra. En farmacia y bioquímica en la ejecución del proyecto de investigación*



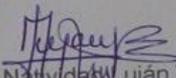
## Anexo 4

*Constancia de colaboración de Manuela Natividad Luján Velásquez, Biólogo – Microbiólogo en la ejecución del proyecto de investigación.*

### CONSTANCIA

Yo, Manuela Natividad Luján Velásquez, Biólogo – Microbiólogo docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 2132.

Mediante la presente dejo constancia de estar asesorando a la alumna ELÍAS PRADO KATHERINE ELIZABETH, en la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado EFECTO ANTIFÚNGICO “*IN VITRO*” DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA MIEL Y PROPÓLEOS DE *Apis mellifera* EN PREPARACIÓN MIXTA SOBRE *Candida albicans* ATCC 10231.

  
Manuela Natividad Luján Velásquez  
Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología  
Universidad Nacional de Trujillo.

-----  
Dra. Manuela Natividad Luján Velásquez  
CATEDRA DE INMUNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Anexo 5

Factura de compra: *Candida albicans* ATCC 10231



**GenLab**  
del Perú SAC  
Tecnologías para la Vida  
RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jr Cápec Yupanqui N° 2434 Lince, Lima - PERU (AB Cdra. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)  
Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Luigancho, Lima, Lima  
Central Telef.: 203-7500 Telefax (51-1) 203-7501  
e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

R.U.C. 20501262260

**FACTURA**

0003- N° 0003654

Fecha	Vencimiento	Condiciones de Pago	A.C.
23/05/2017	23/05/2017	CONTADO	56

Sr(es): **UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE**

Dirección: **JR. TUMBES NRO. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCIERO - CHIMBOTE SANTA ANCA**

R.U.C.: **20319956043** N° de Guía de Remisión: \_\_\_\_\_ Ped N°: **016738**

N° de O.C.: \_\_\_\_\_ At.: \_\_\_\_\_ N° Pedido: \_\_\_\_\_

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
H03918-A	<b>KWIK-STIK™ Candida albicans derived from ATCC® 10231™*</b>	1	312.94000	312.94

**SON:** TRESCIENTOS SESENTA Y NUEVE CON 27/100. SOLES

S.E.U.O.

NOTA: DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO DE CANCELACIÓN, SE RECARGARA EL INTERÉS LEGAL POR EL TIEMPO QUE TRASCURRA PARA LA CANCELACIÓN DE ESTA FACTURA. LOS CHEQUES DEBERÁN SER GIRADOS ÚNICA Y EXCLUSIVAMENTE GEN LAB DEL PERU S.A.C.

CANCELADO / CANJEADO

Lima, 23 de mayo de 2017

**GenLab del Perú S.A.C.**

**CANCELADO**

Por \_\_\_\_\_ p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.

DNI: \_\_\_\_\_

**SUB TOTAL** S/. 312.94

**I.G.V.** (18%) S/. 56.33

**TOTAL** S/. 369.27

ADQUIRENTE O USUARIO

Anexo 6

Factura de compra: Sabouraud Dextrose Agar 500 g



**GenLab**  
del Perú SAC  
Tecnologías para la Vida  
RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jl. Cáque Tiguayco N° 2434 Lima, Lima - PERU (A.C. Cda. 8 Av. 3 de Mayo San Isidro)  
Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Lurigancho, Lima, Lima  
Central Tel.: 203-7500 Telefax (51-1) 203-7501  
e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

R.U.C. 20501262260

**FACTURA**

0003- N° 0003664

Fecha	Vencimiento	Condiciones de Pago	A.C.
29/05/2017	29/05/2017	CONTADO	56

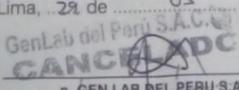
Sr(es): UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE  
 Dirección: JR. TUMBES NRO. 247 CENTRO COMERCIAL Y FINANCIERO - CHIMBOTE SANTA ANCA  
 R.U.C. 200319956043 N° de Guía de Remisión Ped N° 016785  
 N° de O.C.: At: N° Pedido

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
021071-A	Sabouraud Dextrose Agar 500 g Medium for yeasts and moulds isolation. E.P.	1	138.94000	138.94

SON: CIENTO SESENTA Y TRES CON 95/100 SOLES S.E.U.O.

O/P: ..... CANCELADO / CANJEADO

NOTA: DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO DE CANCELACIÓN, SE RECARGARÁ EL INTERÉS LEGAL POR EL TIEMPO QUE TRASCURRA PARA LA CANCELACIÓN DE ESTA FACTURA. LOS CHEQUES DEBERÁN SER GIRADOS ÚNICA Y EXCLUSIVAMENTE GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Lima, 29 de 05 de 17  
  
 p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.

SUB TOTAL S/. 138.94  
 I.G.V. (18%) S/. 25.01  
**TOTAL S/. 163.95**

ADQUIRENTE O USUARIO

Anexo 7

**RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO: obtención de propóleos (sierra liberteña)**

**Obtención de Propóleos**



**Obtención de miel**



## Anexo 8

### *Preparación de los extractos hidroetanólicos*



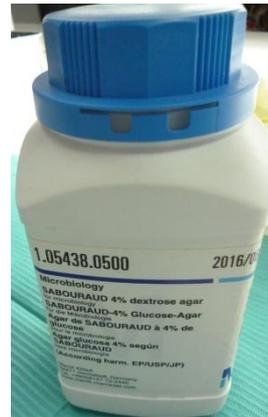
## Anexo 9

### Reactivación de la cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231

Cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231.



sabouraud 4% dextrose agar.



Cultivo liofilizado de la cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231



Sembrado del cultivo liofilizado en tubo con 5 ml de caldo sabouraud



Nefelómetro de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  bact./mL)



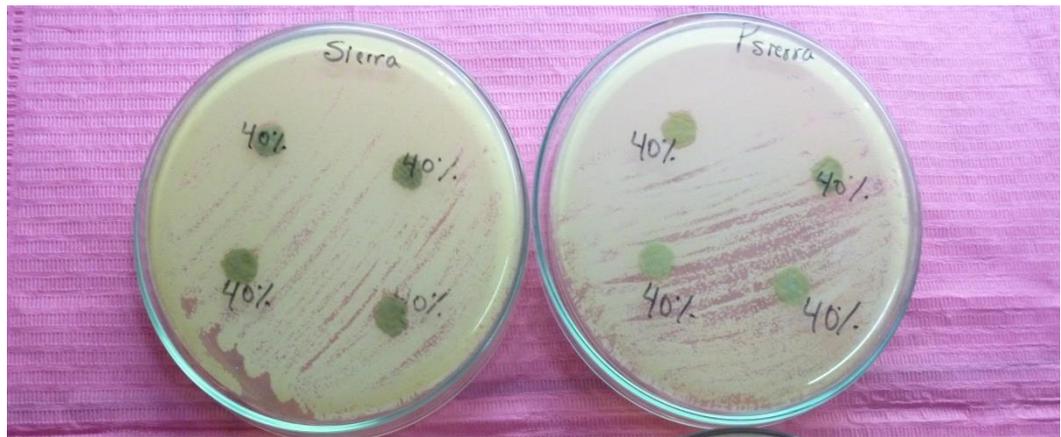
Suspensión de la levadura Obtenida



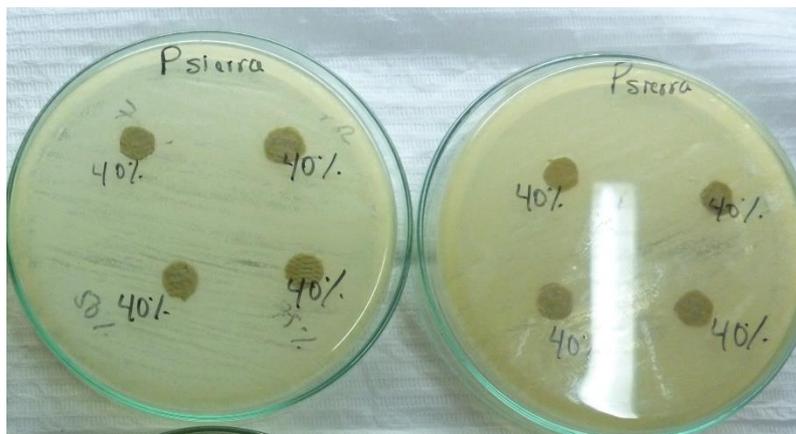
## Anexo 10

### Halos de inhibición a al 40%

**Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 producido por el extracto hidroetanólico de propóleos de *Apis mellifera* procedente de la sierra liberteña en la concentración de 40 %.**



**Diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 producido por el extracto hidroetanólico de miel de *Apis mellifera* procedente de la sierra liberteña en la concentración de 40 %.**



## Anexo 11

**Tabla 4.** Comparar el efecto antifúngico, entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231. Determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, método Kirby Bauer.

CONCENTRACION N	MIEL	PROPOL EO	MIEL + PROPOLE O	C- ETANO L	C+ NISTATIN A
	40%	40%	40%		
1.	0	17,00	19,00	0	27,00
2.	0	17,00	19,00	0	28,00
3.	0	19,00	18,00	0	28,00
4.	0	16,00	19,00	0	27,00
5.	0	18,00	20,00	0	27,00
6.	0	20,00	18,00	0	28,00
7.	0	19,00	19,00	0	26,00
8.	0	18,00	18,00	0	26,00
9.	0	19,00	17,00	0	29,00
10.	0	19,00	18,00	0	26,00

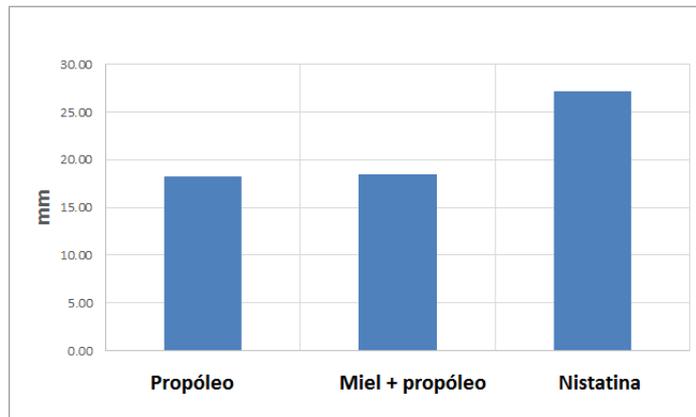
**Tabla 5****Pruebas de normalidad**

Grupos	<u>Shapiro-Wilk</u>			Distribución normal
	Estadístico	<u>gl</u>	Sig.	
Miel	.	10	.	
<u>Propóleo 40%</u>	,924	10	,389	Normalidad
<u>Miel + propóleo</u> 40%	,906	10	,258	Normalidad
Etanol	.	10	.	
Nistatina	,895	10	,191	Normalidad

Al tener menor o igual de 50 datos por cada extracto etanólico y control, es recomendable usar la prueba de normalidad de shapiro-wilk, para evaluar la normalidad de los mismos, donde se observa una distribución normal de datos para: propóleo 40% , miel + propóleo al 40% y nistatina.

## Anexo 12 (GRAFICOS)

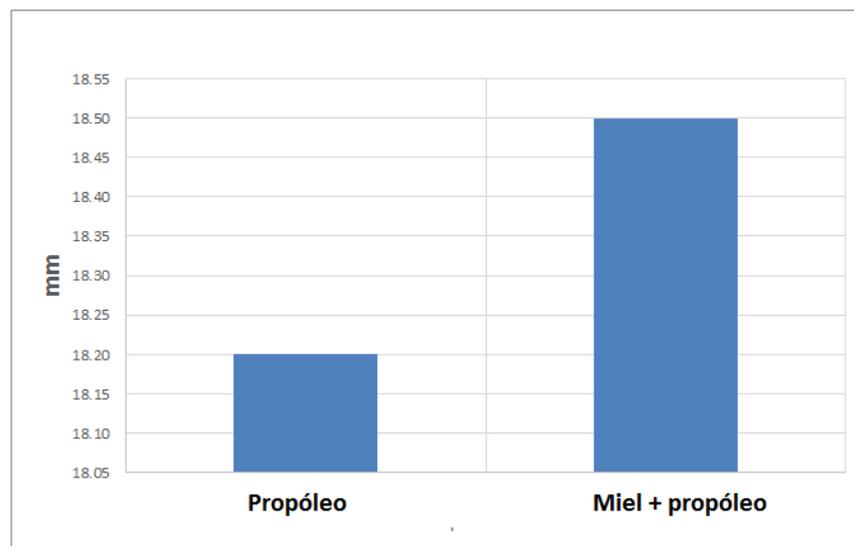
**Grafico 1.** *Evaluar el efecto antifúngico de extracto hidroetanólico de propóleo, extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo, nistatina sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231.*



**Fuente:** *datos proporcionados por el investigador.*

Se observa que la nistatina tiene mayor efecto que los otros dos grupos.

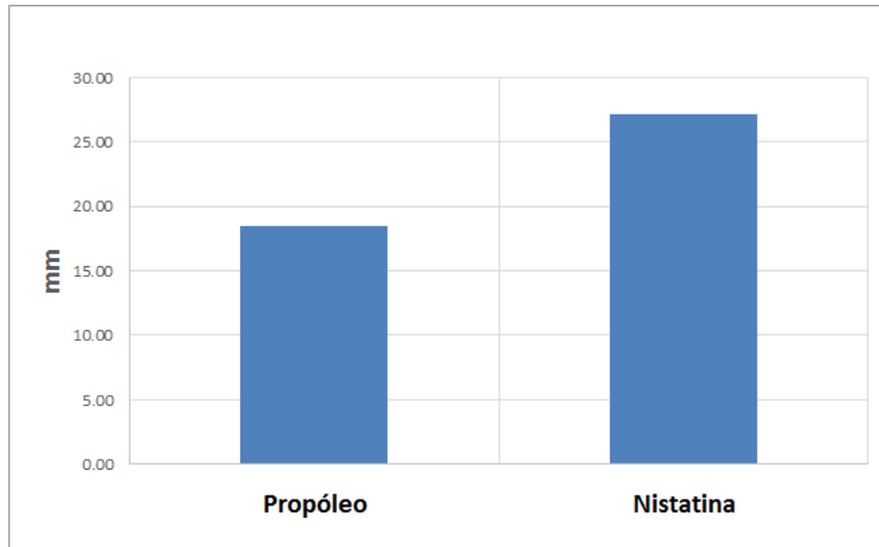
**Grafico 2.** *Comparación del efecto antifúngico entre el extracto hidroetanólico mixto de miel y propóleo vs. extracto hidroetanólico de propóleo sobre cepas de Candida albicans ATCC 10231.*



**Fuente:** *datos proporcionados por el investigador.*

Se observa que se encuentra mayor efecto en el extracto mixto que en el propóleo solo.

**Grafico 3.** Comparación del efecto antifúngico de extracto hidroetanólico mixto de miel con propóleo y Nistatina sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.



*Fuente:* datos proporcionados por el investigador.

Se observa mayor efecto en la nistatina que en el propóleo.