



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIFÚNGICO
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEOS DE LA
SIERRA Y COSTA LIBERTEÑA SOBRE CEPAS DE
Candida albicans ATCC 10231, TRUJILLO – 2018

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

AUTOR:

MENDOZA CARRANZA ELVER MILER

ASESOR:

MGTR. CESAR ABRAHÁM VÁSQUEZ PLASENCIA

TRUJILLO – PERÚ

2019

TÍTULO DE LA TESIS

**ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIFÚNGICO
DEL EXTRACTO ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS DE
LA SIERRA Y COSTA LIBERTEÑA SOBRE CEPAS DE
Candida albicans ATCC 10231, TRUJILLO – 2018**

EQUIPO DE TRABAJO

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Mendoza Carranza Elver Miler

ASESOR

Mgr. Vásquez Plasencia César Abrahám

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

HOJA DE DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedicamos principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres, José Ulises Mendoza Rodríguez y Marcela Carranza Haro por el apoyo mutuo que me brindaron.

A Katherine Elías Prado, por estar siempre en los momentos más difíciles brindándome su apoyo con palabras de aliento.

A mis hermanas (os) por estar siempre presentes, acompañándonos y por el apoyo moral, que nos brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida.

HOJA DE AGRADECIMIENTO

Agradecer en primer lugar a dios quien me guió y dió la fortaleza de seguir adelante, por haberme permitido cumplir mis metas y objetivos trazados.

También agradecer a mi querida casa de estudios la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote por alojarme en estos 5 años de vida universitaria

A los todos los docentes de la escuela profesional de odontología de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, quienes nos guiaron con sus conocimientos para poder ser un profesional con éxito.

A mis amigos que siempre estuvieron apoyándome en las buenas y en las malas.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Dr. César Vásquez Plasencia por ser el principal colaborador durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo comparar el efecto antifúngico entre los extractos etanólicos de propóleo de la sierra y costa liberteña sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Se realizó un estudio de diseño experimental, transversal, prospectivo. La muestra estuvo conformada por 12 placas de Petri con cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Para este estudio se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *Candida albicans*. La evaluación del efecto de los extractos etanólico de propóleos se realizó mediante el método Kirby Bauer. Se preparó discos estériles de papel filtro whatman número 3, los cuales fueron embebidos con 30 ul de extracto etanólico al 40 % de propóleos de la sierra y de la costa Liberteña. Luego, con una pinza estéril, fueron colocados los discos sobre las placas de Müeller Hinton, inoculadas con la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. Se incubaron durante 24 horas a 37°C. Después del tiempo de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición (mm) para lo cual se utilizó una regla milimetrada Mitutoyo digital Vernier. Para el extracto etanólico de propóleo de la sierra Liberteña se obtuvo una medida media de 19.100 mm, y el extracto etanólico de propóleo de la costa Liberteña una medida media de 15.400 mm. Para la cual se utilizó la prueba estadística ANOVA. Se concluye que el propóleo de la sierra liberteña presento mayor efecto antifúngico que el de la costa.

Palabras claves: Propóleos, nistatina, antifúngica, candida, albicans.

ABSTRACT

The objective of the research was to compare the antifungal effect between the ethanolic extracts of propolis from the sierra and the coast of La Libertad on strains of *Candida albicans* ATCC 10231. An experimental, cross-sectional, prospective design study was carried out. The sample consisted of 12 Petri dishes with strains of *Candida albicans* ATCC 10231. For this study, a lyophilized culture of the *Candida albicans* strain was used. The evaluation of the effect of the ethanol extracts of propolis was carried out using the Kirby Bauer method. Sterile discs of filter paper whatman number 3 were prepared, which were imbibed with 30 ul of ethanol extract to 40% of propolis from the sierra and the coast of Liberteña. Then, with a sterile forceps, the discs were placed on the plates of Müeller Hinton, inoculated with the strain of *C. albicans* ATCC 10231. They were incubated for 24 hours at 37 ° C. After the incubation time, the diameters of the inhibition halos (mm) were measured, for which a Mitutoyo digital Vernier millimeter rule was used. For the ethanol extract of propolis of the Liberteña mountain range, an average measurement of 19,100 mm was obtained, and the ethanol extract of propolis of the Liberteña coast, an average measure of 15,400 mm. For which the ANOVA statistical test was used. It is concluded that the propolis of the sierra liberteña had a greater antifungal effect than that of the coast.

Keywords: Propolis, nystatin, antifungal, candida, albicans.

CONTENIDO

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de trabajo.....	iii
3. Jurado evaluador de tesis.....	iv
4. Hoja de dedicatoria.....	v
5. Hoja de agradecimiento.....	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.....	23
IV. Metodología.....	23
4.1 Diseño de la investigación.....	23
4.2 Población y muestra.....	24
4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	26
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	27
4.5 Plan de análisis.....	31
4.6 Matriz de consistencia.....	32
4.7 Principios éticos.....	33
V. RESULTADOS.....	33
5.1 Resultados.....	34
5.2 Análisis de resultados.....	37
VI. CONCLUSIONES.....	40
Aspectos complementarios.....	40
Referencias bibliográficas.....	42
Anexos.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Evaluación del efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña, extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña, etanol y nistatina sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.....	34
Tabla 2 Comparación del efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña, costa liberteña, etanol y nistatina sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.....	35
Tabla 3 Prueba Duncan.....	36
Tabla 4 Pruebas de normalidad.....	66

INDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1 Evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña, extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña, etanol y nistatina sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.....	67
Grafico 2 Comparación del efecto antifúngico entre los extractos etanólicos de propóleo de la sierra y costa liberteña sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231.....	67
Grafico 3 Comparación del efecto antifúngico entre el extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña y Nistatina sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 1023.....	68
Grafico 4 Comparación del efecto antifúngico entre el extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña y Nistatina sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 1023.....	68

I. INTRODUCCIÓN

La candidiasis oral es una de las enfermedades más frecuentes de la mucosa bucal, sin dudas la afección micótica más común en esta localización. La magnitud de la infección micótica depende fundamentalmente de las condiciones del hospedero, pues el establecimiento del padecimiento ocurre cuando se perturban los parámetros de equilibrio fisiológico que mantienen la homeostasia del medio bucal^{1, 2}. La especie más importante desde el punto de vista médico odontológico como agente etiológico de infección es la *C. albicans*². La *candida albicans* dentro de su género ha sido considerada la especie con más alta patogenicidad, responsable de infecciones dentro de la cavidad oral, incluso en estados más graves se ha producido septicemias e incluso la muerte.³

El propóleo es un material de origen natural, se han encontrado diferencias en la composición química y la actividad biológica dependiendo de la flora circundante a la colmena, las condiciones climáticas, el lugar donde se encuentra y el proceso de recolección utilizado.^{3,4}

La utilización de los medicamentos ha venido produciendo resistencia a los medicamentos así como también niveles altos de toxicidad dentro del organismo, por todo esto se ha incrementado el interés por buscar medicamentos que puedan remplazar a los fármacos sintéticos brindando nuevas oportunidades terapéuticas.³

Por consecuente, tenemos la necesidad de combatir la *candidida albicans* mediante su prevención y tratamiento, a base de productos ecológicos y naturales como el propóleo, los cuales podrán estar al alcance de toda la comunidad por su fácil acceso, bajo costo y, sobre todo, por los pocos efectos secundarios que presenta.⁵

Recientemente, se ha puesto especial atención en el propóleo, que es un producto natural que ha mostrado interesantes propiedades medicinales. Este por lo general es muy beneficioso frente al tratamiento de diversos microorganismos obteniendo propiedades curativas, en especial propiedades antifúngicas.^{6,7}

Por lo expuesto anteriormente nos planteamos el siguiente problema ¿Cuál es el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de propóleos de la sierra y costa liberteña sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231?, Y como objetivo de este trabajo es realizar un estudio Comparativo del efecto antifúngico, in vitro, entre los extracto etanólico de propóleos de la sierra y costa liberteña sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.

En la parte de metodología el presente estudio tuvo diseño experimental, transversal, prospectivo. La muestra estuvo conformada por 12 placas de Petri con cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231. Para este estudio se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *Candida albicans*. La evaluación del efecto de los extractos etanólicos de propóleos se realizó mediante el método Kirby Bauer.

Después del tiempo de incubación se midieron los diámetros de los halos de inhibición (mm) para lo cual se utilizó una regla milimetrada digital Mitutoyo Vernier con ISO de calidad 17025. Para el extracto etanólico de propóleo de la sierra Liberteña se obtuvo una medida media de 19.100 mm, y el extracto etanólico de propóleo de la costa Liberteña una medida media de 15.400 mm. Para la cual se utilizó la prueba estadística Anova. Se concluye que el propóleo de la sierra liberteña presentó mayor efecto antifúngico que el de la costa liberteña.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes:

Gil M¹ et al. (Venezuela- 2013), en su investigación titulada, **Efecto fungistático y fungicida del extracto etanólico de propóleos sobre especies de candida** y tuvieron como objetivo determinar el efecto fungistático y fungicida de un extracto etanólico de propóleos comercial al (70% v/v) proveniente de un apiario del Estado Cojedes Venezuela *C. albicans*. La metodología utilizada fue la técnica de macrodilución en tubo. El extracto de propóleos demostró efecto fungistático total a 15% sobre Complejo *Candida albicans* a 48 horas de incubación. El efecto fungistático parcial fue observado en 24 horas de incubación. El efecto fungistático en 24 horas fue de 11%. El efecto fungicida en 48 horas de incubación fue de 11 y 15%. Se evidencia que el tiempo de incubación más eficaz fue el de 48 horas. El presente trabajo demostró que el extracto etanólico del propóleos tiene efecto fungistático y fungicida in vitro en las cepas de *Candida albicans*

García A⁸, et al. (México 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 removibles**, y tuvieron como objetivo determinar la efectividad de los extracto etanólico de propóleo comerciales en el estado Mérida, para la eliminación de *C. albicans* en muestras de resina acrílicas solidas de prótesis parcial removible. Se probaron extracto etanólico de propóleo de diferentes proporciones (20%, 30%, 40%). Se realizaron dos pruebas: la asepsia de las muestras de acrílico sumergidas en los diferentes Extracto etanólico de Propóleo por 5min, 10min, 15min, 20min y 8 h, posteriormente se realizó la difusión de agar con porcillo para determinar los halos de inhibición. Se

encontró en un primer tiempo que en las placas de Petri se presentó crecimiento de *C. albicans* solamente en el control; en segundo tiempo de difusión en agar, los halos de menor diámetro de inhibición fue para el Extracto Etanólico de Propóleo al 20%, y los porcentajes de 30% y 40% produjeron halos de mayor diámetro, teniendo actividad antifúngica de tipo fungicida a partir de las 24 h. frente a *Candida albicans*.

Ramírez T⁹ y Vilcapaza M, (Peru- 2016), en su investigación titulada, “**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 odontologica, UNA puno - 2016**” y tuvieron como objetivo determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo sobre microorganismo de *Cándida albicans* que colonizan la cavidad bucal de pacientes adultos de la Clínica Odontológica de la Universidad Nacional del altiplano Puno, este estudio es racional, transversal, experimental, de tipo prospectivo utilizando un muestreo no probabilístico por conveniencia. Iniciaron con la extracción del extracto etanólico de Propóleo. Se utilizó el método de Kirby Bauer para definir el efecto inhibitorio, las cepas de *Cándida albicans* fueron expuestas en distintas concentraciones de extractos etanólicos de propóleo (25%, 50%, 75%,100 %) durante 24 h. La concentración de 50% obtuvo un halo de inhibición de 6.95 mm, al 75% con un halo de 8.6 mm y al 100% un halo de 11.8 mm. Se concluye que a mayor concentración de extracto etanólico de propóleo, presenta mayor efecto antifúngico sobre *Cándida albicans*.

De la Cruz M¹⁰ (Perú- 2013) en su investigación titulada, **actividad antimicótica del extracto etanólico de Propóleo sobre el crecimiento in vitro de *Cándida***

albicans. El propósito de esta investigación de tipo experimental “in vitro”, fue evaluar el efecto antimicótico de cuatro concentraciones de extracto etanólico de Propóleo sobre el crecimiento de *Cándida albicans* y a la vez compararlo con el antimicótico sintético Nistatina. Este estudio se realizó utilizando 4 concentraciones del extracto etanólico de Propóleo (25%, 50%, 75% y ,100%), y el medicamento Nistatina (100 000 UI solución) las cuales fueron puestas en contacto con el microorganismo de estudio y mediante el método de halos de inhibición se pudo determinar el efecto en el crecimiento de este, a las 24 horas. Los resultados indicaron que la actividad antimicótica del extracto etanólico de Propóleo fue aumentando conforme aumentaba la concentración siendo la concentración del 100% la de mayor efecto antimicótico, pero este no fue superior al medicamento sintético Nistatina utilizado como referencia.

Martins R¹¹ y et al. (Brazil - 2002), en su investigación titulada, **Efecto del extracto comercial de etanol propóleo en el crecimiento in vitro de Candida albicans recolectado de pacientes brasileños VIH-seropositivos y VIH-seronegativos con candidiasis oral.** Y tuvieron como objetivo evaluar la susceptibilidad de cepas de *Candida albicans*, recogidas de pacientes con VIH con candidiasis oral, a un 20% de extracto de etanol de propóleos comercial (EPE) y compararlo con la acción inhibidora de los agentes antifúngicos estandarizados nistatina (estado de Nueva York), el clotrimazol (CL), econazol (CE), y fluconazol (FL). Doce *C. albicans* cepas recogidas de pacientes con VIH con candidiasis oral se ensayaron. Las zonas de inhibición se midieron con un pachimeter y los resultados se presentan como medias y la desviación estándar (M +/- SD). Los datos se analizaron estadísticamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis no

paramétrico. EPE inhibió todas las *C. albicans* es Sobrecarga probados. No se observó ninguna diferencia significativa entre los resultados obtenidos con NYS y EPE, mientras que se observaron diferencias significativas entre EPE y otros antifúngicos. Las cepas de *C. albicans* probados mostraron resistencia a los agentes antifúngicos restantes. El extracto de propóleo utilizado en este estudio inhibió el crecimiento in vitro de *C. albicans* recogidas de pacientes brasileños seropositivos al VIH, la creación / formación de zonas de inhibición como aquellos formados por NYS. Este hecho sugiere que la EPE comercial podría ser una medicina alternativa en el tratamiento de la candidiasis de pacientes VIH-positivos. Sin embargo, en estudios in vivo del efecto de la EPE son necesarios para determinar sus posibles efectos en la mucosa oral.

Viloria J¹² y et al.(Colombia 2016) en su investigación titulada, **Actividad in vitro de Extractos Etanólicos de Propóleos del bajo cauca antioqueño sobre dos hongos filamentosos y uno levaduriforme.** Tuvieron como objetivo principal evaluar la actividad antifúngica in vitro de los extractos etanólicos de propóleos (EEP), obtenidos a partir de muestras provenientes de apiarios experimentales de investigación, ubicados en la región del Bajo Cauca antioqueño, sobre *Candida albicans*. El propóleo fue recolectado por los métodos de malla y de raspado, durante diferentes periodos del año. Mediante la técnica de macrodilución en caldo, se evaluaron seis dosis de EEP, en un rango de 156 a 5000 $\mu\text{g/mL}$ -1 y se determinó la concentración que inhibió el 80 y el 50% del crecimiento del hongo. Los resultados indican que el método de recolección del propóleo presentó diferencias significativas con respecto al crecimiento de *C. albicans*. En conclusión, los extractos evaluados exhibieron un actividad inhibitoria del crecimiento moderada,

en comparación con el control y el hongo levaduriforme, *C. albicans* presentó la mayor sensibilidad frente a los EEP analizados. Adicionalmente, el método de recolección del propóleo solo presentó diferencias significativas respecto a la concentración mínima inhibitoria, encontrada para *C. albicans*.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Fitoterapia:

Es una disciplina medicinal que se encarga de estudiar el adecuado uso de la medicina natural, mostrando todas las propiedades farmacológicas existentes para ser empleadas de manera preventiva o curativa de una alteración patológica.¹²

La utilidad de las plantas medicinales han despertado el interés de escritores científicos, en los últimos años el aumento de medicamentos naturales han venido aumentando.¹²

2.2.2 *Cándida albicans*

Es una levadura patógena oportunista que es un miembro común de la flora intestinal humana. No prolifera fuera del cuerpo humano. Se detecta en el tracto gastrointestinal y la boca en 40 a 60% de los adultos sanos. Por lo general, es un organismo comensal, pero puede volverse patogénico en individuos inmunocomprometidos en diversas condiciones. Es una de las pocas especies del género *Cándida* que causa la candidiasis infección humana, que resulta de un crecimiento excesivo del hongo. La candidiasis se observa a menudo en pacientes infectados por el VIH. *C. albicans* es la especie de hongo más común aislada de biofilms que se forma en dispositivos médicos implantados (permanentes) o en tejido humano.¹³

2.2.2.1 Etimología

Cándida albicans puede verse como una tautología. Cándida proviene de la palabra latina candidus, que significa blanco. Albicans en sí es el participio presente de la palabra latina albicō, que significa volverse blanco. Esto lleva a que el blanco se vuelva blanco, lo que lo convierte en una tautología.¹³

A menudo se denomina brevemente candidiasis, candidiasis o cándida. Se han usado más de cien sinónimos para describir a *C. albicans*. Más de 200 especies han sido descritas dentro del género cándida. La referencia más antigua a la candidiasis bucal, probablemente causada por *C. albicans*, se remonta al año 400 aC en el trabajo de Hipócrates de las epidemias que describen la candidiasis oral.¹³

2.2.2.2 Morfología

C. albicans exhibe una amplia gama de fenotipos morfológicos debido al cambio fenotípico y la transición de yema a hifa. La transición de levadura a hifa (filamentación) es un proceso rápido e inducido por factores ambientales. El cambio fenotípico es espontáneo, ocurre a tasas más bajas y en ciertas cepas se conocen hasta siete fenotipos diferentes. El mecanismo de cambio mejor estudiado es el cambio de blanco a opaco. También se han descrito otros sistemas. Hay dos sistemas (el sistema de conmutación de alta frecuencia y el cambio de blanco a opaco) Cambio en *C. albicans* a menudo, pero no siempre, influenciada por las condiciones ambientales, tales como el nivel de CO₂, condiciones anaerobias, medio utilizado y la temperatura. En su forma de levadura, *C. albicans* varía de 10 a 12 micrones. Las esporas pueden formarse en las pseudohifas llamadas clamidiosporas para sobrevivir cuando se ponen en condiciones desfavorables, como las estaciones secas o cálidas.¹³

2.2.2.3 Cándida albicans bucal

2.2.2.3.1 Patógeno

Cándida es un hongo y se aisló por primera vez en 1844 del esputo de un paciente con tuberculosis. Al igual que otros hongos, son organismos eucariotas no fotosintéticos con una pared celular que se encuentra fuera de la membrana plasmática. Hay un complejo nuclear de poros dentro de la membrana nuclear. La membrana plasmática contiene grandes cantidades de esteroides, generalmente ergosterol. Aparte de algunas excepciones, las características culturales macroscópicas y microscópicas de las diferentes especies de candida son similares. Pueden metabolizar la glucosa tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. La temperatura influye en su crecimiento con temperaturas más altas, como 37 ° C, que están presentes en su potencial huésped, lo que promueve el crecimiento de las pseudohifas. Han sido aislados de animales y fuentes ambientales. Requieren fuentes ambientales de carbono fijo para su crecimiento. Varios estudios han demostrado que la infección con candida está asociada con ciertas variables patógenas. La adhesión de candida a las paredes celulares epiteliales, un paso importante en el inicio de la infección, es promovida por ciertos componentes fúngicos de la pared celular, como la manosa, los receptores C3d, las manoproteínas y las sacarinas. Otros factores implicados son la formación de tubos germinales, Presencia de micelios, persistencia dentro de las células epiteliales, endotoxinas, inducción del factor de necrosis tumoral y proteinasas. Cambio fenotípico que es la capacidad de ciertas cepas de *C. albicans* cambiar entre diferentes fenotipos morfológicos también se ha implicado.¹³

2.2.2.3.2 Factores locales

El deterioro de la función de la glándula salival puede predisponer a la candidiasis oral. Las proteínas antimicrobianas en la saliva, como la lactoferrina, la sialoperoxidasa, la lisozima, los polipéptidos ricos en histidina y los anticuerpos específicos contra la cándida, interactúan con la mucosa oral y evitan el crecimiento excesivo de candida. La inmunidad de la mucosa local vuelve a la normalidad al interrumpir los esteroides inhalados. Las dentaduras postizas predisponen a la infección por cándida en hasta el 65% de las personas mayores que usan dentaduras postizas superiores. El uso de prótesis dentales produce un microentorno propicio para el crecimiento de candida con bajo oxígeno, bajo pH y un entorno anaeróbico. Esto puede ser debido a una mayor adherencia de *Candida* sp. Al acrílico, flujo reducido de saliva debajo de las superficies de las prótesis dentales, dentaduras mal ajustadas o mala higiene bucal. Otros factores son el cáncer oral / leucoplasia y una dieta alta en carbohidratos. El crecimiento de la cándida en la saliva se ve favorecido por la presencia de glucosa y su adhesión a las células epiteliales orales se ve aumentada por una dieta alta en carbohidratos.^{12, 13}

2.2.2.3.3 Factores sistémicos

Los extremos de la vida predisponen a la infección debido a la inmunidad reducida. Las drogas, como los antibióticos de amplio espectro, alteran la flora oral local y crean un ambiente adecuado para que la candida prolifere. Los fármacos inmunosupresores, como los agentes antineoplásicos, han demostrado en varios estudios predisponer a la candidiasis oral al alterar la flora oral, alterar la superficie de la mucosa y alterar el carácter de la saliva. Otros factores son el tabaquismo, la diabetes, el síndrome de Cushing, las afecciones inmunosupresoras, como la infección por el VIH, las neoplasias malignas como la leucemia y las deficiencias

nutricionales; las deficiencias de vitamina B han sido particularmente implicadas.^{12,13}

Radica en nuestra cavidad bucal, puede ser patógena y causar infecciones en pacientes con bajas defensas, embarazadas, pacientes con diabetes o aquellos que están expuestos a rayos X, saliva ácida, xerostomía, tabaquismo, lesiones erosivas en la mucosa bucal, mala higiene oral, uso descontrolado de antisépticos orales. La infección por *Cándida* en boca puede migrara hacia la faringe, laringe, y en casos complicados logra extenderse por la sangre.¹³

2.2.2.3.4 Morfología.

La *Cándida* es una hongo unicelular de forma ovalada o redonda con paredes delgadas de 3 a 5 micras, en su estado activo poseen aspecto de filamentos, son gram positiva y aerobias, y no tienen pigmentación carotenoide o melánico.¹²

2.2.2.3.5 Cultivo

La levadura se desarrolla en un medio de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa. El medio de cultivo debe caracterizarse por obtener los principales componentes químicos para así proporcionar un habitat apropiado para la cepa *Cándida albicans*.¹²

2.2.2.4 *Candida albicans* (Robin) Berkhout (ATCC ® 10231™)¹⁴

2.2.2.4.1 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.¹⁴

Las células se alargarán y formarán pseudohifas ramificadas similares a cadenas en cultivos más antiguos.¹⁴

2.2.2.4.2 Métodos de cultivo¹⁴

- **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

2.2.2.4.3 Historia¹⁴

- **Aislamiento**

- Hombre con bronquomicosis

2.2.3 Apicultura en el Perú

La apicultura en el Perú es una herramienta positiva en las zonas rurales del país en desarrollo. Al requerir poco capital o tierra, la apicultura es accesible para aquellos con recursos financieros limitados, y también puede mejorar los rendimientos agrícolas a través de la polinización; también depende de los recursos naturales renovables. Sin embargo, pocos estudios han evaluado las variables críticas que afectan el éxito del desarrollo de la apicultura o las han evaluado en un contexto regional o nacional particular.¹⁵

Poco se sabe sobre la apicultura y las características de su práctica en el Perú. El censo agrícola nacional de 1961 informó el número de colmenas y la producción de

miel, polen, jalea real y propóleo pero los datos, especialmente con respecto a la producción de miel, polen, jalea real y propóleo son dudosos. Los censos agrícolas posteriores no han enumerado estadísticas sobre la apicultura.¹⁵

El Perú se divide comúnmente en tres regiones ecológicas principales: la costa, la sierra (el altiplano andino), y la selva o montaña (las selvas tropicales y sabanas de la cuenca hidrográfica de la cuenca amazónica). Esta región del este de la Amazonía está subdividida genéricamente en la selva alta (selva alta) y la selva baja (selva baja). La apicultura se practica en la mayor parte del país, pero principalmente en la sierra, costa, y selva.¹⁵

2.2.4 Propóleo (própolis)

2.2.4.1 Historia

El propóleo fue usado por el hombre como medicina tradicional desde el 300 a. C. Los investigadores declararon que las actividades curativas de los propóleos fueron identificadas por los médicos romanos y griegos, así como por otros científicos, como Dios corides, Galen, Aristoteles y Plinio. De manera similar, los médicos utilizaron el propóleo de manera eficiente para el tratamiento de lesiones durante la batalla anglo-boer, así como en la Segunda Guerra Mundial.¹⁶

Los primeros egipcios usaban propóleos para preservar sus cuerpos de la descomposición y para curar heridas porque eran conscientes de las propiedades putrefactivas de los propóleos. Además, el propóleo fue reconocido como un agente antibacteriano durante los siglos XVII y XX en Europa. En Inglaterra, el propóleo fue reconocido como una mejor medicina para el tratamiento de heridas durante el siglo XVII. De manera similar, en China, el propóleo fue reconocido como un medicamento contra el cáncer y contra la infección. El primer informe científico

sobre propóleos, su composición y acciones químicas se anunció al público en 1908. En el siglo XVII se usó como barniz.¹⁶

2.2.4.2 Definición

El concentrado de propóleos es una resina que las abejas adquieren de los árboles principalmente de las yemas u otros vegetales, posterior a eso las abejas en el interior de la colmena finalizan su proceso. Las abejas la emplean para proteger las paredes y orificios de su colmena y mantenerla sin microorganismos. Posee actividad contra microbios, aumenta la capacidad del sistema inmunitario, combate la inflamación y el dolor y es cicatrizante. Por tal motivo es utilizado para tratar la estomatitis, úlceras y otras enfermedades.^{16,17}

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.¹⁷

2.2.4.4 Composición de propóleos

El propóleo se recolecta en zonas calidas como en zonas tropales y es ligeramente diferente. Se han identificado más de 180 componentes diferentes en propóleos en general, con cada nuevo análisis se encuentra nuevos componentes. El propóleo contiene polifenol (flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres), aldehídos y cetonas

fenólicos, etc. El porcentaje de estas sustancias es el siguiente: resinas y bálsamo vegetal 50%, cera de abeja 30%, polen 5%, aceites esenciales y aromáticos 10% y algunas otras sustancias que también incluyen compuestos orgánicos. El porcentaje de material diverso presente en el propóleo depende del momento de su recolección y también del origen geográfico.¹⁷

2.2.4.5 Flavonoides

El propóleo en su composición química se a podido identificar más de 180 componentes complicados entre estos compuestos se sugirieron los flavonoides. Este compuesto es el responsable de las actividades antimicrobianas por lo tanto, el contenido de flavonoides es considerado como un índice importante para evaluar la calidad de los propóleos. El análisis de los flavonoides en propóleo ha sido realizado por métodos colorimétricos, cromatografía de capa fina, cromatografía de gases, espectrometría de masas y cromatografía líquida de alto rendimiento. Dentro de los cuatro grupos principales de flavonoides en propóleos, solo se utilizaron flavonas y flavonoles.¹⁸

2.2.4.6 Aplicación biomédica del propóleo.

El uso de propóleo tiene un gran efecto en la salud humana y se utiliza para diversos fines. Hoy en día, se utiliza como antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, antiviral, anestésico, antioxidante, antitumoral, antiprotozoario, anticáncer, antihipertensivos, anticancerígenos y antihepatotóxicos además de poseer actividad citotóxica, etc.^{17,18}

2.2.4.7 Actividad antifúngica del propóleo.

El propóleo mostró actividad contra diferentes hongos. Se investigó que, el propóleo inhibe los hongos aflatoxigénicos, y también disminuye el crecimiento de

conidios en *Aspergillus flavus*. Propóleos de diferentes áreas muestran actividad contra *Candida guilliermondii*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. albicans*. En otra investigación, se utilizó efectivamente un propóleo francés contra patógeno fúngico humano. *C. albicans*, *C. glabrata*, fumigaciones de *Aspergillus*. Un componente del propóleo llamado pinocembrina muestra actividad contra *Penicillium italicum*, que detiene el crecimiento del micelio y actúa sobre la respiración del patógeno y la homeostasis energética. También mostró un efecto fungicida contra la levadura. La presencia de flavonoides en el propóleo muestra actividad fungicida contra *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* y *Pichia ohmeri*, *C. famata*, *C. glabrata*. También mostró actividad antifúngica hacia *C. albicans*. Debido a la mayor cantidad de pinocembrina. Se informó que los constituyentes de propóleos, tales como 3-acetilpinobanksina, pinobanksin-3-acetato, pinocembrina, ácido p-cumárico y ácido cafeico de 26 o más constituyentes muestran actividad antifúngica. Además, el ácido cafeico mostró actividad antimicótica hacia el carbono *Helminthosponum*. El propóleo mostró un buen resultado contra las micobacterias, *Candida*, *Trichophyton*, *Fusarium* y otros hongos que infectan la piel.¹⁸

2.2.4.8 Propiedad antibacteriana de los propóleos.

Existe evidencia inequívoca de que el propóleo exhibe propiedades antibacterianas notables a pesar de las modificaciones en las estructuras químicas y la recolección de diferentes regiones geográficas. La prueba sugiere que esta resina natural es eficaz contra las barras grampositivas además de *Mycobacterium tuberculosis*, con actividad restringida contra los bacilos gramnegativos. El extracto etanólico de propóleo (EEP) muestra una alta eficacia contra las cepas de bacteroides y *Peptostreptococcus*, pero muestra menos eficacia contra las cepas de *Clostridium*,

Eubacterium y Archnia. 22 Se descubrieron tres compuestos antimicrobianos a partir del propóleo brasileño, principalmente de ácido diprenil-4-hidroxicinámico, ácido 3-prenil-4-dihdrocinnamoloxyinnamic y ácido 6-carboxi-e-thenil-2H-1-bezopirano de 22-dimetilo, de los cuales el compuesto inicial muestra la mayor actividad contra las bacterias y es uno de los principales Compuestos antimicrobianos. Además, la EEP mostró sinergismo con ciertos antibióticos y demostró la capacidad de mejorar las acciones de los antifúngicos. Existe un interés médico creciente en el potencial antimicrobiano de propóleo solo o en combinación con ciertos antibióticos y antifúngicos. ¹⁸

2.2.4.9 Actividad antiviral del propóleo.

Los extractos de propóleo demostraron altos niveles de actividad antiviral contra el virus del herpes simple-1 (HSV-1). Los métodos de acción antiviral de los propóleos implicaron agregar extracto de propóleos en diferentes momentos durante el ciclo de infección viral. Ambos extractos de propóleo mostraron una alta actividad anti-HSV-1 cuando los virus fueron tratados previamente con estos medicamentos antes de la infección. Se observó actividad anti-HIV-1 con muestras de propóleos de varias regiones geográficas. El mecanismo de la propiedad antiviral del propóleo en los linfocitos CD4 + parecía implicar, en parte, la inhibición de la entrada viral, mientras que el propóleo tenía un efecto antiviral aditivo en la inhibidora de la transcriptasa inversa zidovudina. Isopentyl ferulate en extracto de propóleos tiene efectos inhibitorios significativos sobre el virus de la influenza (H3N2) in vitro. ¹⁸

2.2.4.10 Propiedad anticancerígena de propóleos

El ácido cafeico-fenetil éster (CAPE) en el propóleo es una terapia de apoyo

potencial para pacientes con carcinoma oral de células escamosas (OSCC). El tratamiento con CAPE inhibe la proliferación y la formación de colonias y suprime las células de OSCC. Además, los pacientes que reciben quimioterapia se benefician del co-tratamiento con CAPE. La evidencia defiende que la CAPE somete e inhibe las células del revestimiento del cáncer de mama, próstata, cáncer de pulmón y cáncer de boca. La CAPE tiene un efecto inhibitor y se puede usar como agente químico para prevenir la metástasis del cáncer.³⁵ El tratamiento con CAPE ha demostrado defender o proteger los tejidos y órganos vitales contra las toxinas producidas durante la quimioterapia.^{17,18}

El propóleo ha mostrado resultados abrumadores y una mejor calidad de vida en pacientes con mucositis, un efecto secundario de la radioterapia y la quimioterapia. Se encontró que el ingrediente natural es seguro y tiene características tanto de prevención como de tratamiento en pacientes sometidos a radioterapia y quimioterapia.

Propiedad antiinflamatoria y propóleos.¹⁸

El componente principal del propóleo es CAPE, que es un compuesto biológicamente activo. CAPE tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Dado que la CAPE es lipófila, puede ingresar fácilmente a la célula para inhibir las enzimas LOX y COX, que inhiben indirectamente la vía araquidónica. La inhibición del ácido araquidónico previene la liberación de prostaglandinas y leucotrienos responsables de la inflamación y el dolor. CAPE también mejora la producción de citoquinas antiinflamatorias IL4 e IL10. Además, disminuye la infiltración de monocitos y neutrófilos.¹⁸

2.2.4.11 El papel del propóleo en el cuidado dental.

El propóleo es un material natural que se obtiene principalmente del panal y ha mostrado un potencial prometedor para varias aplicaciones bio-dentales.¹⁸

2.2.4.12 Propóleo y caries dental

La caries dental es considerada como una de los mayores problemas de salud pública dental. Las técnicas de cepillado a medida, la alteración de la dieta y el uso de fluoruros desempeñan un papel considerable en la prevención de lesiones cariosas. datos sugieren que el uso de "miswak" junto con una técnica adecuada como complemento del cepillado dental es bueno para la salud oral y sistémica.⁶ De manera similar, la evidencia de diferentes estudios evaluó el efecto del propóleo en la vulnerabilidad de *Streptococcus mutans*, caries El desarrollo y la actividad de la glicosil transferasa en ratas y encontró que el extracto de propóleo tiene efectos cariostáticos. De manera similar, los resultados indiscutibles de los autores mostraron que los extractos de propóleos limitan la formación de placa en la superficie del diente, lo que indirectamente reduce la caries dental. los ácidos grasos en el propóleo proporcionan un efecto cariostático al disminuir la tolerancia de los microorganismos a un pH bajo y al disminuir la producción de ácido.¹⁸

2.2.4.13 Propóleo y salud periodontal

Los efectos múltiples y diversos de los propóleos sobre la salud oral han llevado a su uso en enfermedades periodontales. La irrigación subgingival con extractos de propóleos durante el tratamiento periodontal arrojó mejores resultados que el alisado y el raspado de las raíces. Además, los extractos de propóleos, cuando se usan en las bolsas gingivales, son beneficiosos para las enfermedades periodontales. Un estudio sobre el cuadro histológico y morfológico estableció que la aplicación de propóleos previene sistemáticamente una mayor pérdida ósea en condiciones

periodontales en ratas.¹⁸

2.2.4.14 Efectos nocivos del propóleo y retos futuros.

El efecto secundario más común y reportado de los propóleos es la alergia al material resinoso cum-ceroso. Treinta y siete apicultores alemanes de 1051 eran alérgicos al propóleo y mostraron síntomas de erupciones en la piel después de trabajar profesionalmente en granjas de abejas. De manera similar, Brailo et al informaron un caso subjetivo de una mujer de 20 años que experimentó erosiones irregulares cubiertas por pseudomembranas que afectaban los labios y la mucosa oral. Usó ungüentos a base de propóleos para el tratamiento de las úlceras aftosas. Además, Zirwas y Otto afirmaron que con el tiempo los casos de propóleos alérgicos aumentaron del 0,4% al 1,4%. Además, debido a ciertas impurezas en el propóleo, existe poca literatura para recomendarlo en mujeres embarazadas. La preparación de propóleos puede contener altos niveles de alcohol y puede provocar náuseas cuando se toma como complemento de metronidazol. Los contenidos en propóleos pueden interactuar con antivirales, anticancerígenos, antibióticos y antiinflamatorios y pueden manifestar reacciones alérgicas que pueden ir desde eccema, queilitis, dolor oral, edema labial y descamación de los labios. Además, se deben realizar más investigaciones para definir los parámetros del uso de propóleos tanto en el campo dental como en el medicinal.¹⁸

2.2.5 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.¹⁷

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 β (1,3) 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)¹⁹

2.2.5.1 Nistatina

Es un antifúngico perteneciente al grupo de los macrolidos polienicos, es utilizada para diferentes situaciones clínicas infecciones fungicas 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.¹⁹

2.2.5.2 Usos médicos

Las infecciones de *Candida* en la piel, la vagina, la boca y el esófago generalmente responden bien al tratamiento con nistatina. Está disponible en muchas formas.

La nistatina oral a menudo se usa como tratamiento preventivo en las personas con

riesgo de infecciones micóticas, como los pacientes con SIDA con un recuento bajo de CD4 + y las personas que reciben quimioterapia. Se ha investigado su uso en pacientes después de un trasplante de hígado, pero se descubrió que el fluconazol es mucho más efectivo para prevenir la colonización, la infección invasiva y la muerte. Es efectivo en el tratamiento de la candidiasis oral en personas mayores que usan dentaduras postizas.

También se usa en bebés de muy bajo peso al nacer (menos de 1500 g o 3 lb 5 oz o) para prevenir infecciones fúngicas invasivas, aunque el tratamiento preferido es el fluconazol. Se ha encontrado que reduce la tasa de infecciones fúngicas invasivas y también reduce las muertes cuando se usa en estos bebés.¹⁹

Se prescribe en 'unidades', con dosis que varían desde 100,000 unidades (para infecciones orales) hasta 1 millón (para las intestinales). Como no se absorbe desde el intestino, es bastante seguro para el uso oral y no tiene problemas de interacciones con otros medicamentos. En ocasiones, los niveles séricos del fármaco se pueden identificar por administración oral, vaginal o cutánea y provocar toxicidad.¹⁹

2.2.5.3 Efectos adversos²⁰

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

2.2.5.4 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^+ , 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.²⁰

III. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de propóleo de la sierra presenta mayor efectividad antifúngica que el de la costa liberteña sobre cepas de *Candida albicans*. ATCC 10231.

IV. METODOLOGÍA:

4.1 Diseño de la investigación:

- Experimental:** Porque se manipuló el extracto etanólico de propóleo para así poder observar el efecto antifúngico sobre *Cándida albicans* mediante un control.²⁶
- **Transversal:** Porque se realizó una sola medición un momento único en el tiempo dentro del estudio.²⁶
- **Prospectivo:** Porque se midió el efecto antifúngico sobre *Candida albicans*,

cuando se inició el estudio. ²⁶

- **Analítico:** porque en el estudio se relacionó el extracto etanólico de propóleo y el efecto antifúngico sobre *Candida albicans*.²⁶

4.2 Población y muestra:

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

- **Criterios de selección**

- **Criterios de Inclusión:**

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

- **Criterios de exclusión:**

- Placas Petri con halos de inhibición no claros.

- Placas Petri de *Candida* con signos de contaminación.

- Placas Petri de *Candida* obsoletas de restablecerse en el medio de cultivo.

- **Muestra:**

- Tamaño de Muestra**

- El tamaño de muestra para el presente estudio es:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2s^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

Dónde:

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

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

$S = 0.8 (p_1 - p_2)$ el cual es un valor asumido por no haber estudios similares.

Luego Reemplazando obtenemos:

$n = 10$ repeticiones

Luego la muestra estuvo conformada por $n = 10$ repeticiones por cada tratamiento.

Se usaron 10 discos por cada grupo experimental

4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	VALOR FINAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION
Variable independiente Extracto etanólico de propóleo	Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, usando un solvente como etanol. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo.	Sustancia que se obtendrá a partir de los protocolos establecidos a base de propóleo macerada en una sustancia etanólica la cual será utilizada para comprobar y comparar su actividad antifúngica frente a cepa de Candida albicans ATCC 10231	Origen de propóleo	Propóleo de la sierra liberteña Propóleo de la costa liberteña	Cualitativa	nominal
Variable dependiente Efecto antifúngico sobre cándida albicans	Toda sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.	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 Instrumento:

- Para la recolección de datos después del enfrentamiento microbiológico se utilizó una ficha de datos (anexo 1)
- Para medir el efecto antifúngico se utilizó una regla Mitutoyo digital Vernier caliper 0 150mm/0,01mm métrico/pulgada Calibre 196-500-30 con ISO de calidad 17025 (anexo 2)

4.4.3 Procedimiento

a) Recolección de propóleo y transporte

Se recolectó el propóleo de dos lugares diferentes, uno de la sierra Liberteña (Otuzco) y el otro de la costa Liberteña (Chepen). (anexo 6)

Las recolecciones de los propóleos se realizaron mediante el entrampado,²² ya que nos ofrece mejor calidad y menos contaminación de las muestras.

El transporte del propóleo se realizó en un cooler y se llevó al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

b) Preparación de los extractos etanólicos de propóleo

Para la elaboración de los extractos etanólicos se solicitó la colaboración a la Dra Marilu Soto, la preparación de los extractos etanólicos se llevaron a cabo en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. (Anexo 3)

Antes de preparar el extracto etanólico de propóleo, se procedió a eliminar las impurezas visibles que se encuentren en el propóleo, tales como virutas de madera, partes de abejas, restos vegetales. Luego el propóleo se fraccionó en trozos de 2 cm aproximadamente y fue colocado en refrigeración a 0 °C por 24 horas para solidificarlas. Posteriormente se procedió a pulverizar con ayuda de un mortero de porcelana hasta obtener polvo. Luego, el polvo se tamizó con ayuda de un set de tamices para uniformizar las partículas. se guardó en un frasco de color ámbar .²¹(anexo 7)

Se pesó 100 g de propóleo y se colocó en un frasco estéril de vidrio ámbar de boca ancha ocupando como máximo $\frac{3}{4}$ del frasco; Luego fue cubierto con etanol al 96 % 2 cm por encima de la muestra para luego combinarse bien, se tapó y macero por una semana, agitándose de 10 a 15 minutos dos veces al día Transcurrido 7 días de maceración, se filtró el líquido al vacío, con papel de filtro Whatman N° 1. Al líquido filtrado se le nombró extracto etanólico de propóleo.

A continuación, el extracto etanólico de propóleo se concentró en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a presión moderada y temperatura establecida, no mayor a 50°C. Finalmente, el extracto se colocó en cápsulas de porcelana y se llevará a secar a la estufa a 40 °C. Al producto resultante se le denominó extracto etanólico de propoleo seco. A partir de este extracto seco se prepararon la concentración de 40% disueltas en etanol al 96%. Finalmente, los extractos etanólicos se guardaron en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su utilización microbiológica.^{21, 22}, (anexo 7)

c) Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de propóleo

A partir del extracto etanólico de propóleo obtenido de cada una de las muestras se procedió a preparar la concentración que fueron empleados en la investigación que fueron empleados, como sigue: (anexo7)

- Extracto etanólico de propóleo de la sierra Liberteña 40 % v/v
- Extracto etanólico de propóleo de la costa Liberteña 40 % v/v.

1. Protocolos microbiológicos

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 *Cándida albicans* (Anexo 4) y Sabouraud Dextrose Agar 500 g (Anexo 5).

a) Reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Para este estudio se utilizó 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 incubará a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó coloración gram.

La cepa se mantuvo en caldo BHI y en Agar Sabouraud, hasta su posterior utilización²³ (anexo 8)

b) 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, con el fin de obtener colonias jóvenes. (anexo8)

Luego, de 24 horas cada colonia de *C. albicans* ATCC 10231 se colocó en solución salina fisiológica estéril y se hicieron suspensiones con una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bact./mL)²³.(anexo8)

c) Inoculación

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5×10^8 bact/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocó en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton suplementado con 2 % de glucosa (AMHG), con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuyó la suspensión de la levadura en tres direcciones para asegurar una igualdad del inóculo en la placa, se eliminó el exceso de humedad a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos. (anexo8)

d) Enfrentamiento microbiológico de Extracto etanólico de propóleo de la sierra Liberteña y costa Liberteña vs *C. albicans* ATCC 10231.

Mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar, se evaluó el efecto de los extractos etanólicos de propóleos ²⁴. Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

Se elaboraron discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales con una micropipeta fueron embebidos con 30 ul de cada una de las concentraciones de 40% de extracto etanólico de propóleo de la sierra y de la costa Liberteña. Luego,

con una pinza estéril, fueron colocados los discos sobre las placas de Mueller Hinton (AMHG) inoculadas con *C. albicans* ATCC 10231.²⁴ (anexo 9)

e) Incubación:

Se incubaron las placas, a 37°C durante 24 horas . (Anexo 9)

f) Lectura de los resultados

Pasado 24 horas de incubación se examinó placa por placa y procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición (mm) del crecimiento alrededor de cada disco.²³ para lo cual se utilizó regla milimetrada Vernier digital marca mitutoyo con ISO de calidad (9001), abarcando el diámetro del halo. (Anexo 10)

Se realizaron 10 repeticiones de cada una de las concentraciones.

4.5 Plan de análisis

Los datos obtenidos fueron incorporados en el programa IBM SPSS Statistics versión 23 trabajándose con la prueba estadística ANOVA y 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

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Población
<p>¿Cuál es el efecto antifúngico del extractos etanólicos de propóleos de la sierra y costa liberteña sobre cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?</p>	<p style="text-align: center;">Objetivo General:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Comparar el efecto antifúngico entre los extracto etanólicos de propóleo de la sierra y costa liberteña sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231. <p style="text-align: center;">Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo de la sierra sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231. • Evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleos de la costa liberteña sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231. • Comparar el efecto antifúngico entre el extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña y Nistatina sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 1023. • Comparar el efecto antifúngico entre el extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña y Nistatina sobre cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 1023. 	<p>El extracto etanólico de propóleo de la sierra presenta mayor efectividad antifúngica que el de la costa liberteña sobre cepas de <i>Candida albicans</i>. ATCC 10231.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Extracto etanólico de propóleo • Efecto antifúngico sobre <i>Cándida albicans</i> 	<p>Población: cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231</p> <p>Muestra: La muestra estuvo conformada por n = 10 repeticiones para cada tratamiento.</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 del extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña, extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña, etanol y nistatina sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.*

Concentración	N	Media	Desviación típica	95% del intervalo de confianza para la media	
				Límite inferior	Límite superior
Sierra 40%	10	19,1000	2,13177	17,5750	20,6250
Costa 40 %	10	15,4000	1,17379	14,5603	16,2397
etanol	10	,0000	,00000	,0000	,0000
nistatina	10	26,6000	2,50333	24,8092	28,3908
total	40	15,2750	9,96401	12,0884	18,4616

ANOVA

Fuente: datos proporcionados por el investigador.

Se evaluó el efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña, extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña, etanol y nistatina sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231. Se determinó para el extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña una medida media de 19.10 mm en un rango con valor mínimo de 17,57 mm y con valor máximo de 20,62 mm. Para el extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña una medida media de 15.40 mm en un rango con valor mínimo de 14,56 mm y con valor máximo de 16,23 mm. Para el etanol una medida media de 00,00 mm en un rango con valor mínimo de 00,00 mm y con valor máximo de 00,00 mm. Para la nistatina una medida media de 26,60 mm en un rango con valor mínimo de 24,80 mm y con valor máximo de 28,39 mm.

Tabla 2

*Comparación del efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña, costa liberteña, etanol y nistatina sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.*

Concentración	N	Media	Desviación típica	95% del intervalo de confianza para la media		P*
				Límite inferior	Límite superior	
Sierra 40%	10	19,1000	2,13177	17,5750	20,6250	
Costa 40 %	10	15,4000	1,17379	14,5603	16,2397	
etanol	10	,0000	,00000	,0000	,0000	0.000
nistatina	10	26,6000	2,50333	24,8092	28,3908	
total	40	15,2750	9,96401	12,0884	18,4616	

ANOVA

Fuente: datos proporcionados por el investigador.

Nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

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

Tabla 3

Prueba Duncan

La prueba Duncan, permite comparar tratamientos no relacionados, es decir todos los tratamientos contra todos a fin de establecer un orden de merito

Duncan

Grupos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Etanol	10	,0000			
Costa 40 %	10		15,4000		
Sierra 40 %	10			19,1000	
Nistatina	10				26,6000
Sig.		1,000	1,000	1,000	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.

La prueba de Duncan encontró que el halo de inhibición promedio del etanol, propóleo de la costa, sierra y nistatina, cada uno forma un subconjunto presentando diferencia estadística significativa entre sí.

5.2 Análisis de resultados

En las últimas tres décadas los estudios químicos y farmacológicos han aumentado, demostrando que los propóleos de distintas regiones geográficas tienen diferentes composiciones, propiedades medicinales y actividad antifúngicas¹². A partir de los hallazgos encontrados aceptamos la hipótesis general que el extracto etanólico de propóleo de la sierra presenta mayor efectividad antifúngica que el de la costa liberteña sobre cepas de *Candida albicans*. ATCC 10231. Esto se debe al lugar de procedencia de donde se obtuvo cada propóleo, los propóleos utilizados en el presente estudio, el de la sierra Liberteña fue obtenida de la ciudad de Otuzco y el de la costa liberteña de la ciudad de Chepen. Las recolecciones de los propóleos se realizaron mediante el atrapado, ya que nos ofrece mejor calidad y menos contaminación de las muestras. Luego los propóleos se colocaron en frascos de vidrio estériles. El transporte del propóleo se realizó en un cooler y se llevará al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. El propóleo de la sierra liberteña presentó una consistencia resinosa; de color marrón pardo oscuro; y el de la costa liberteña tuvo un aspecto de trozos semiduros; con un color que varía entre un pardo a marrón claro. Las características encontradas son parecidas a las encontradas por Calla K y Quispe D¹³ ya que ellas estudiaron diferentes propóleos de distintos lugares del Perú, por lo que se podríamos concluir que las características descritas son propias de los propóleos y difieren del lugar que se han extraídos.

También se encontró diferencia estadística al comparar el propóleo de la sierra liberteña con la nistatina frente a cepas de *Cándida albicans* ATCC 1023; Igualmente al comparar el extracto etanólico de propóleo de la Costa liberteña y Nistatina sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 1023 se encontró que hay diferencia estadística entre los dos grupos de concentración, donde la nistatina tuvo halos de inhibición de mayor diámetro para estos dos grupos de comparación. Se concluye que la nistatina viene siendo el antifúngico ideal frente a cepas de *Candida albicans* ya que fue el que presentó los halos de mayor diámetro de inhibición pero tiene efectos secundarios, en cambio el propóleo es un medicamento natural que puede ser utilizado sin tener ningún efecto secundario ya que es atóxico.

La *Candida albicans* ATCC 10231 es susceptible a la gran mayoría de diferentes concentraciones etanólicas de propóleo ^(1, 8, 9, 10, 11, 12). Se demostró que los dos extractos etanólicos de propóleos liberteños probados en este estudio presentaron actividad antifúngica contra *C. albicans*, teniendo relación con el estudio de Gil M et al. Donde se han reportado que el propóleos presenta actividad antifúngica y fúncida sobre la *Candida albicans*, aunque lo hagan a concentraciones diferentes, guardando relacion con nuestro estudio.

En nuestro estudio se estudiaron los extractos etanólicos de propóleo al 40% pasado las 24 horas tuvieron actividad antifúngica, nuestros resultados guardan relacion con lo que sostiene Gil M et al¹; García A et al⁸; Ramírez T et al.⁹; De la Cruz M¹⁰; Martines R¹¹ ^(1, 8, 9, 10, 11) Quienes señalan que la actividad antifungica es apartir de las 24 horas. Según la investigación de, De la Cruz M¹⁰ indicó que la

actividad antimicótica del extracto etanólico de Propóleo sobre el crecimiento in vitro de *Cándida albicans* fue aumentando conforme aumentaba la concentración siendo la concentración del 100% la de mayor efecto antimicótico, pero este no fue superior al medicamento sintético Nistatina utilizado como referencia. Se puede decir que al comparar con nuestro estudio se obtuvieron resultados diferentes siendo los resultados muy lejanos al extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña pero teniendo más cercanía con el extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña, tanto el propóleo de la costa liberteña como el propóleo que utilizo De la Cruz M¹⁰ procedieron de las costas peruanas.

El presente estudio difiere con el estudio de Ramírez T et al.⁹; De la Cruz M¹⁰; Martins R y et al.¹¹ Ya que en sus estudios obtuvieron halos de menor diámetro, a los que obtuvimos en nuestro estudio. Hay que tener en cuenta que la composición química del propóleos es heterogénea y depende de la vegetación que predomina alrededor de la colmena (aproximadamente en un radio de 2 km), la estación del año así como de su origen geográfico.¹³

El presente estudio difiere con el estudio de García A et al.⁸ en el cual obtuvo halos de mayor diámetro. Esto puede ser por diferentes razones una de ellas es el solvente, ya que nosotros utilizamos etanol y en el estudio de García A. Ucar A. y Ballester L.⁸ los extractos fueron realizados artesanalmente el cual se desconoce el tipo de solvente que utilizaron, otro factor la procedencia, método de recolección de donde se extrajo el propóleo siendo esto indispensable para que determine la calidad del propóleo.

Finalmente esta investigación nos permite demostrar que debemos tener en cuenta que la composición química del propóleo es heterogénea y depende de la vegetación que predomina alrededor de la colmena, la estación del año, el método de recolección, así como de su origen geográfico. Y esta sería una de las causas que el extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña tenga un rango mayor de inhibición que el extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña.

VI. COCLUSIONES

- El extracto etanólico de la sierra liberteña presentó mayor efecto antifúngico que el de la costa liberteña frente a cepas de *Cándida albicans* ATCC 1023.
- En este estudio se demostró que los dos extractos etanólicos de propóleos liberteños probados presentaron actividad antifúngica contra *Candida albicans* ATCC 1023.
- la Nistatina presentó mayor efecto antifúngico que el extracto etanólico de la sierra liberteña frente a cepas de *Cándida albicans* ATCC 1023.
- la Nistatina presentó mayor efecto antifúngico que el extracto etanólico de la costa liberteña frente a cepas de *Cándida albicans* ATCC 1023.

ASPECTOS COMPLEMENTARIOS

- Realizar más estudios de la actividad antimicrobiana y antifúngica de propóleos, hacia otros microorganismos y hongos.
- Se sugiere desarrollar trabajos de investigación, in vivo, para determinar la actividad y el nivel de toxicidad que puede generar el extracto etanólico de

propóleo, así mismo se debe estimar la dosis terapéutica para su utilización en la población.

- Indagar sobre otras posibles propiedades farmacológicas del propóleo.
- Realizar estudios con extractos etanólicos de propóleo de diversas regiones del Perú y comparar la actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral comparándolos entre ellos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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
2. Rodríguez O, Miranda T, Morejón L, Santana G, Julio C. Candidiasis de la mucosa bucal: Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Estomatol* [serie en Internet]. 2002 Ago [citado 30 de abril 2017]; 39(2): 187-233. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200007
3. Chamba L. Efecto antifúngico del aceite esencial del *origanum vulgare* (orégano) y *cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *Candida albicans* en comparación con la nistatina estudio in vitro. tesis para optar grado de bachiller en odontología. Quito – Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología; 2015. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3538/1/T-UCE-0015-93.pdf>
4. Polsigua T. Antibioticoterapia en el manejo de las patologías de los tejidos blandos de la cavidad bucal. tesis para optar grado de bachiller en odontología. Guayaquil: Universidad de Guayaquil, Facultad Piloto de Odontología; 2014. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/5263/1/POSLIGUAteresa.pdf>
5. Moromi H, Martínez E, Villavicencio J, Burga J, Ramos D. “Efecto

- antimicrobiano in vitro de la *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. *Odontología Sanmarquina*. [serie en internet]. 2007 [citada 30 abril 2017]; 10(1): 18-20. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/odontologia/2007_n1/pdf/a06.pdf
6. Marinez J. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. [tesis para optar el grado de maestría] Medellín – Colombia: Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2009. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/11052243.pdf>
 7. 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>
 8. 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>
 9. 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. tesis para optar grado de bachillerato en odontología. Puno –Perú: Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias de la Salud

2016 disponible en:

http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2987/Ramirez_Arenas_Tania_Vilcapaza_Condori_Mayda_Nidia.pdf?sequence=1&isAllowed=y

10. De la Cruz L. Actividad antimicótica del extracto etanolico de propoleo sobre el crecimiento in vitro de candida albicans. Tesis para optar grado de bachillerato en odontología, Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
11. Martins R, Péreira E, Lima S, Senna M, Mesquita R, Santos V. Efecto de propóleos etanol comerciales extracto sobre el crecimiento in vitro de Candida albicans recogidos de VIH-seropositivos y pacientes brasileños VIH seronegativos con candidiasis oral. J Sci Oral [serie en internet]. 2002 [citada 30 abril 2017]; 44(1); 41-8. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058869>
12. Viloría J, González J, Durango D, Marín J y Correa C. 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>
13. Calla K y Quispe D. Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del propolis “propóleos” de tres regiones del sur del Perú sobre el crecimiento de Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Pseudomona aeruginosa. tesis para optar grado de bachillerato en odontología; Perú, Universidad Católica de Santa María, disponible en:

<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9436/1/T-UCE-0015-555.pdf>

14. Bondaryk M, Małgorzata B, Wiesław K y Monika S. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postepy Dermatol Alergol*. [serie en internet]. 2013 [citada 30 abril 2017]; 30 (5). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858657/>
15. ATCC. *Candida albicans* (Robin) Berkhout (ATCC ® 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
16. Chaillou L, Maidana J. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Ciênc Tecnol Aliment* [serie en internet]. 2004 [citada 30 abril 2017]; 24:11-15. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v24n1/20033.pdf>
17. Kalogeropoulos N, Spyros K, Troullidou E, Mourtzinis L y Karathanos V. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* [serie en internet]. 2009 [citada 30 abril 2017] ; 116: 452-461. Disponible en: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20093165275>
18. Londoño A, Penieres J, García C, Carrillo L, Quintero M, García S, et al. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha* 2008; 21(1):49-55.
19. Bankova V. Chemical diversity of propolis Martínez - Caracterización del

- propóleos proveniente del municipio de Caldas 2869 makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of Api Product and Api Medical Science* 2009; 1(2):23–28.
20. Raissouni T. Estudio comparativo de la eficacia de varios tratamientos tópicos de la estomatitis aftosa recurrente. Tesis Doctoral: España; Universidad de Granada. 2005. disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1663/1/16910114.pdf>
21. Zain R. Oral recurrent aphthous ulcers/ stomatitis: prevalence in Malaysia and an epidemiological update. *J Oral Sci* [serie en internet]. 2000 [citada 30 abril 2017]; 42: 15-9. disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/josnugd1998/42/1/42_1_15/pdf
https://www.jstage.jst.go.jp/article/josnugd1998/42/1/42_1_15/pdf
22. 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.
23. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 2002; 43:(1,2); 43:(1,2): 187-204.
24. Cantón L, Martín M, Espinel A . Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2007; 978(84).

25. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 2013; 33 (1).
26. Hernández R, Fernández C y Baptista P. Metodología de la investigación McGraw-Hill, 2014

ANEXOS

Anexo 1

Ficha de recolección de Datos

ENSAYOS	Efecto antifúngico (mm)	
	Propóleo de la sierra	Propóleo de la costa
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		

Anexo 2



Anexo 3

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

CONSTANCIA DE COLABORACIÓN

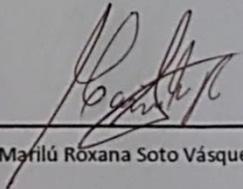
El que suscribe Marilú Roxana Soto Vásquez; docente investigador, doctora en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Hace constar, en la ejecución de la prueba piloto del estudio titulado "ESTUDIO COMPARATIVO, *in vitro*", DEL EFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEOS DE LA SIERRA Y COSTA LIBERTEÑA SOBRE CEPAS DE *Cándida albicans* ATCC 10231". Se colaboró en la elaboración de extractos etanólicos.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.

Trujillo, 13 de Diciembre de 2017




Dra. Marilú Roxana Soto Vásquez
DOCENTE INVESTIGADOR -UNT

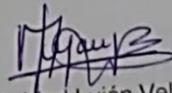
Anexo 4

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 al alumno MENDOZA CARRANZA ELVER MILER, en la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado "ESTUDIO COMPARATIVO, IN VITRO, DEL EFECTO ANTIFUNGICO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEOS DE LA SIERRA Y COSTA LIBERTEÑA 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 INMUNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

Anexo 5

Factura de compra: *cándida albicans* ATCC 10231



GenLab
del Perú SAC
Tecnologías para la Vida

RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima, Lima - PERU (AR Cód. 8 Av. 7 de Mayo San Isidro)
Av. Las Flores de Primavera N° 848 Urb. Las Flores San Juan de Lurigancho, Lima, Lima
Central Tel: 203-7500 Teletax: (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 O.C.: _____

N° de Guía de Remisión _____ Ped N°: 016738

Att.: _____ N° Pedido _____

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
H03918-A	KWIK-STIK™ Cándida albicans derived from ATCC® 10231™*	1	312.94000	312.94

SON: TRESCIENTOS SESENTA Y NUEVE CON 27/100. SOLES S.E.U.O.

O/P: _____

NOTA: DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO DE CANCELACIÓN, SE RECARGARA EL INTERES 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 05 de 17

GenLab del Perú S.A.C.

CANCELADO

p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Por: _____

DNI: _____

SUB TOTAL S/. 312.94

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

TOTAL S/. 369.27

ADQUIRENTE O USUARIO

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.

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima, Lima - PERU (AR. Cota. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)
Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Luiganchico, 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. 20319956043 N° de Guía de Remisión Ped N° 016785

N° de O.C.: Alt.: 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

PEPEGRAAS S.A. R.U.C. 20373514290 SERIE 0003 DEL 3001 al 4000 SUNAT N° 12064097023 FI. 30-12-2015

SON: CIENTO SESENTA Y TRES CON 95/100. SOLES

O.P.

NOTA: DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO DE CANCELACIÓN, SE RECARGARA EL INTERES 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, 29 de 05 de 17

GenLab del Perú S.A.C.

CANCELADO

p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Por: _____

DNI: _____

S.E.U.O.

SUB TOTAL S/. 138.94

I.G.V. (19%) S/. 25.01

TOTAL S/. 163.95

ADQUIRENTE O USUARIO

Anexo 6

RECOLECCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO: obtención de propóleo (sierra y liberteña)



Anexo 7

Preparación de los extractos etanólicos de propóleo

Propóleo recolectado (sierra liberteña)



Propóleo recolectado (costa liberteña)



Propóleo fraccionado en trozos de 2 cm aproximadamente



Refrigeración de propóleos a 0 °C por 24 horas



Pulverizando el propóleo de la costa liberteña con ayuda de un mortero de porcelana



Tamizando el propóleo de la costa liberteña



Pesando 100 g. de propóleos



Colocando el propóleo en un frasco estéril de vidrio ámbar



Añadiendo etanol al 96 % hasta cubrir la muestra por sobre 2 cm de altura



**Maceración en ausencia de luz por 7 días,
agitándose 10 minutos, dos veces al día.**



**Filtrando el líquido al vacío, con papel
de filtro Whatman N° 1.**

**Residuos de extracto etanólico de
propóleo**



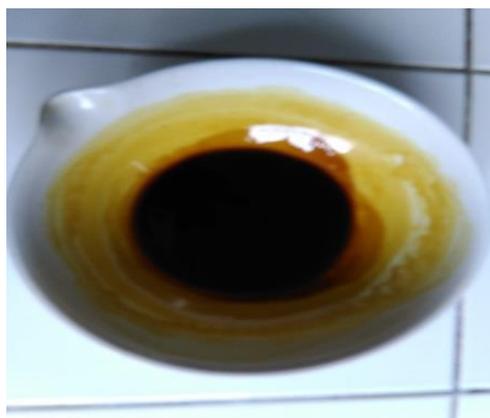
Obtención de extracto etanólico de propóleo (sierra y costa liberteña)



Evaporando los extractos etanólicos en el rotavapor (Heidolph WB 2000)



Extracto blando de propóleo después de sacar del rotavapor (Heidolph WB 2000)



Extracto seco de propóleo después de sacar de la estufa



Preparación de la concentración de 40% de propóleo disueltas en etanol al 96%.



Extracto etanólico de propóleo 40% (sierra y costa liberteña)



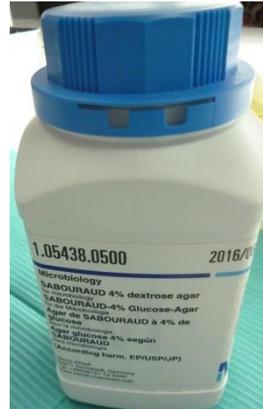
Anexo 8

Reactivación de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231

Cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231.



sabouraud 4% dextrose agar.



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



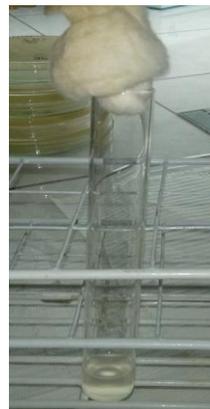
Sembrado del cultivo liofilizado en tubo con 5 ml de caldo sabouraud



Nefelómetro de Mac Farland
(1.5×10^8 bact./mL)



Suspensión de la levadura
Obtenida



Inoculación y Preparación de los discos con el extracto etanólico de propóleos de Apis mellifera.



Se tomó una alícuota de 100µl y se colocó en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton suplementado con 2 % de glucosa

Extracto etanólico de propóleos de *Apis mellifera* procedente de la sierra y de la costa al 40 % Liberteña

Discos de papel filtro whatman número 3 estériles



Anexo 9

Enfrentamiento microbiológico

Discos embebidos con una micropipeta con 30 ul de cada una de las concentraciones de 30 y 40% de extracto etanólico de propóleos de la sierra y de la costa Liberteña.



Los discos son colocados sobre las placas de Mueller Hinton (AMHG) inoculadas con *C. albicans* ATCC 10231 con ayuda de una pinza.



Incubación de las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de las sustancias a evaluar, a 37°C durante 24 y 48 horas.



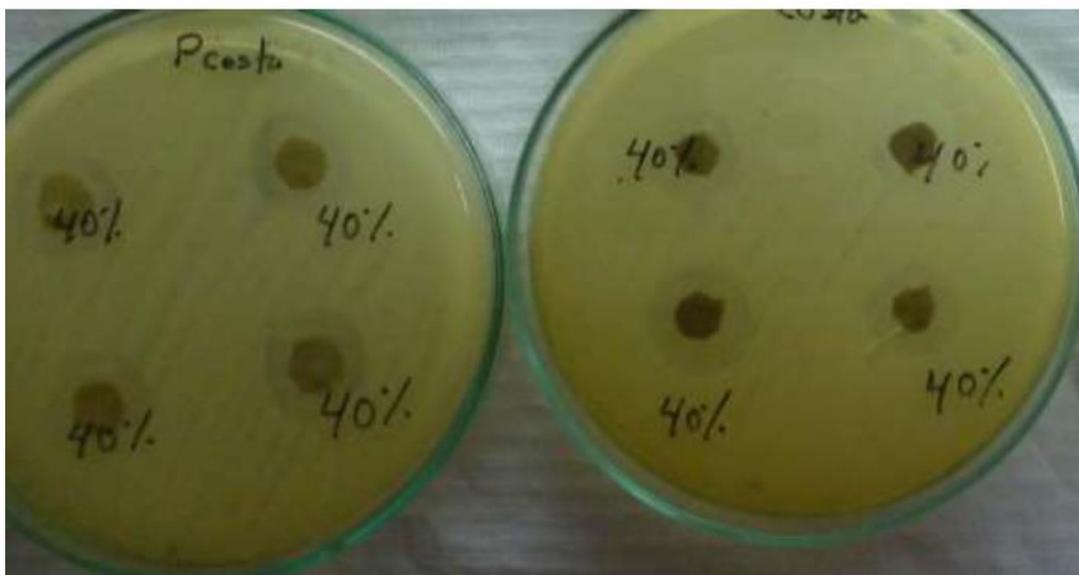
Anexo 10

Lectura de los resultados

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



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



Anexo 11

Comparación del efecto antifúngico de los extractos etanólicos de propóleo de la sierra y costa liberteña sobre *Candida albicans* ATCC 10231 determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, método Kirby Bauer.

CONCENTRACIÓN REPETICIONES	SIERRA	COSTA	C-	C+
	40%	40%		
1.	21,00	14,00	0	27,00
2.	18,00	14,00	0	28,00
3.	21,00	16,00	0	28,00
4.	21,00	17,00	0	27,00
5.	19,00	15,00	0	27,00
6.	20,00	14,00	0	28,00
7.	19,00	16,00	0	26,00
8.	18,00	16,00	0	26,00
9.	20,00	15,00	0	29,00
10.	14,00	17,00	0	20,00

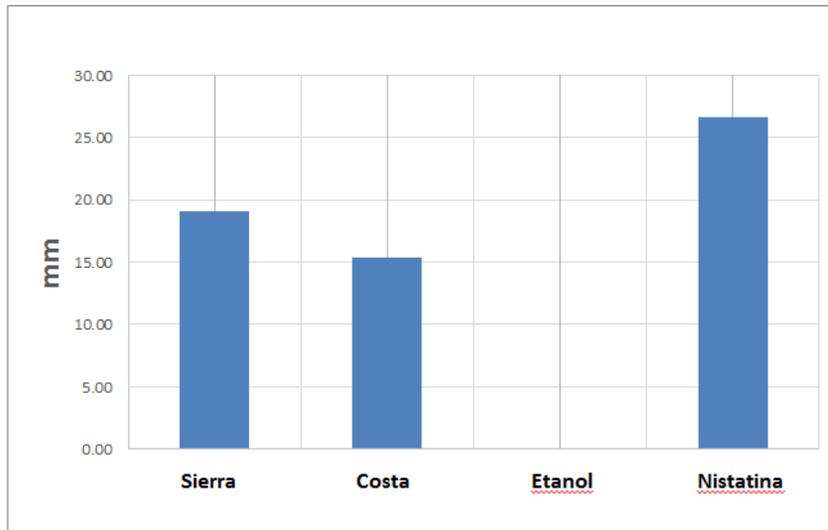
Tabla 4**Pruebas de normalidad**

Grupos	Shapiro-Wilk		Sig.	Distribución normal
	Estadístico	gl		
sierra 40%	,870	9	,122	Normalidad
Costa 40%	,878	10	,124	Normalidad
Etanol	.	10	.	-
Nistatina	,917	9	,364	Normalidad

Al tener menos 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 de la sierra 40% , propóleo de la costa 40% y nistatina.

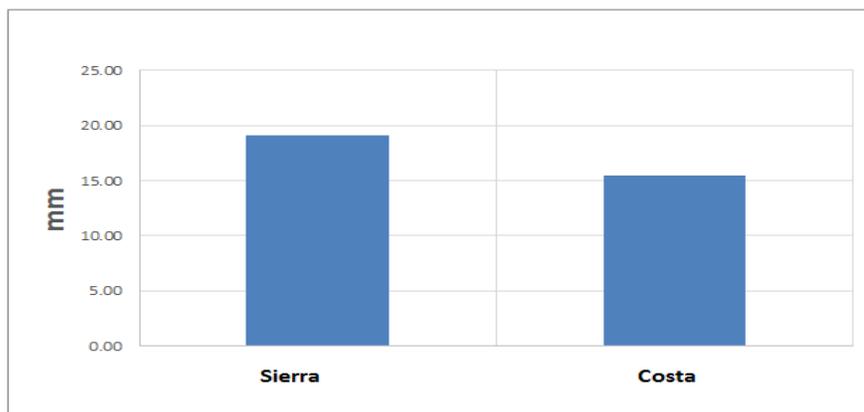
Anexo 12

Grafico 1. *Evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña, extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña, etanol y nistatina sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.*



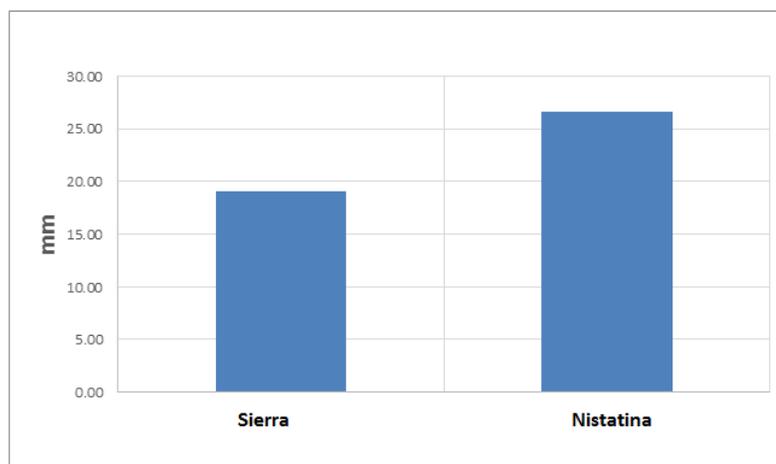
Fuente: datos proporcionados por el investigador.

Grafico 2. *Comparación del efecto antifúngico entre los extractos etanólicos de propóleo de la sierra y costa liberteña sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231.*



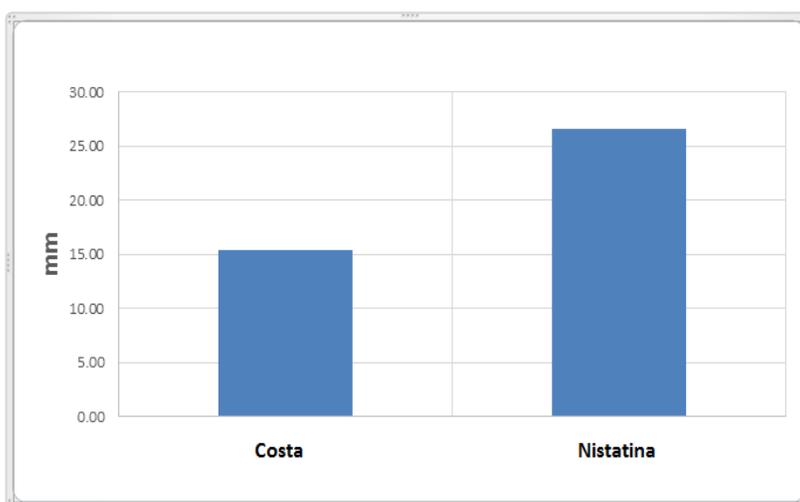
Fuente: datos proporcionados por el investigador.

Grafico 3. Comparación del efecto antifúngico entre el extracto etanólico de propóleo de la sierra liberteña y Nistatina sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 1023.



Fuente: datos proporcionados por el investigador.

Grafico 4. Comparación del efecto antifúngico entre el extracto etanólico de propóleo de la costa liberteña y Nistatina sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 1023.



Fuente: datos proporcionados por el investigador.