



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO, *in vitro*, DE TRES  
MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE EXTRACTOS  
ETANÓLICOS DE PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE  
*Streptococcus mutans* ATCC 25175**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**AUTOR**

**OBANDO PAZ, MARIA ALEJANDRA**

**ORCID: 0000-0003-3475-4081**

**ASESOR**

**HONORES SOLANO, TAMMY MARGARITA**

**ORCID: 0000-0003-0723-3491**

**TRUJILLO – PERÚ**

**2020**

**1. Título:**

EFECTO ANTIBACTERIANO, *in vitro*, DE TRES MÉTODOS  
DE RECOLECCIÓN DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE  
PROPÓLEO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC  
25175

## **2. Equipo de trabajo**

### **AUTOR**

Obando Paz, Maria Alejandra

ORCID: 0000-0003-3475-4081

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Estudiante de Pregrado,  
Trujillo, Perú

### **ASESOR**

Honores Solano, Tammy Margarita

ORCID: 0000-0003-0723-3491

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias de  
la Salud, Escuela Profesional de Odontología

### **JURADO**

Pairazamán García, Juan Luis

ORCID: 000-0001-8922-8009

Morón Cabrera, Edwar Richard

ORCID: 000-0002-4666-8810

Córdova Salinas, Imer Duverli

ORCID: 0000-0002-0678-0162

**3. Hoja de firma del jurado y asesor**

---

Mgtr. Juan Luis Pairazamán García

**Presidente**

---

Mgtr. Edwar Richard Morón Cabrera

**Miembro**

---

Mgtr. Imer Duverli Córdova Salinas

**Miembro**

---

Mgtr. Tammy Margarita Honores Solano

**Asesor**

#### **4. Agradecimientos**

**A mis angelitos,**  
por iluminarme en cada  
paso que doy y espero que  
desde el cielo estén  
orgullosos de mí.

**A mis padres Antero y Julia,**  
por todo el esfuerzo, apoyo y amor  
incondicional que me han brindado en  
estos años de estudio. Porque todo lo  
que soy es por ustedes.

**A todos mis docentes de la escuela de  
Odontología de la Universidad Católica Los  
Ángeles de Chimbote,** por brindarme sus  
enseñanzas y por todo el tiempo que me  
dedicaron para terminar exitosamente esta  
carrera.

**Al apicultor Ulises  
Mendoza,** por su tiempo,  
dedicación y colaboración  
en este estudio.

## 5. Resumen

El estudio tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano, *in vitro*, de tres métodos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El diseño del estudio fue prospectivo, transversal, comparativo, analítico y experimental. La muestra fue 100 µl de una suspensión bacteriana obtenida a partir de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se realizó 5 repeticiones (placa) para cada tipo de recolección y concentración. Se prepararon extractos etanólico de propóleo del caserío el Porvenir, provincia de Otuzco, departamento de La Libertad. Se agruparon los extractos según el tipo de recolección: método de raspado con espátula metálica, método de raspado con espátula plástica y método de malla plástica. Por cada tipo de recolección, se enfrentaron concentraciones al 5 %, 10 % y 30% con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mediante la técnica de Kirby-Bauer. Según la prueba de comparación de medias utilizando la distribución t de Student, se encontró diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) a la concentración de 30% entre el método de raspado con espátula metálica y raspado con espátula plástica. Este último método presentó el mayor halo de inhibición (1.28 cm). Se concluyó que el método de raspado con espátula tiene mayor efecto antibacteriano.

**PALABRAS CLAVE:** Antibacteriano, Própolis, *Streptococcus mutans*.

## **Abstract**

The objective of the study was to determine the antibacterial effect, in vitro, of three methods of collection of ethanolic extracts of propolis on strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The design of the study was prospective, cross-sectional, comparative, analytical and experimental. The sample was 100 µl of a bacterial suspension obtained from the *Streptococcus mutans* strain ATCC 25175, 5 repetitions (plate) were performed for each type of collection and concentration. Ethanolic extracts of propolis were prepared from the El Porvenir village, Otuzco province, La Libertad department. The extracts were grouped according to the type of collection: scraping method with a metal spatula, scraping method with a plastic spatula and plastic mesh method. For each type of collection, concentrations of 5%, 10% and 30% were faced with strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 by means of the Kirby-Bauer technique. According to the means comparison test using Student's t distribution, a highly significant difference ( $p < 0.01$ ) was found at the 30% concentration between the scraping method with a metal spatula and scraping with a plastic spatula. This last method presented the highest inhibition halo (1.28 cm). It was concluded that the scraping method with a spatula has a greater antibacterial effect.

**KEYWORDS:** Antibacterial, Propolis, *Streptococcus mutans*.

<b>6. Contenido:</b>	
1.	Título de la tesis.....I
2.	Equipo de Trabajo.....II
3.	Hoja de firma del jurado y asesor.....III
4.	Hoja de agradecimiento y/o dedicatoria.....IV
5.	Resumen y abstract.....V
6.	Contenido.....VII
7.	Índice de gráficos, tablas y cuadros.....IX
<b>I.</b>	<b>Introducción</b> .....1
<b>II.</b>	<b>Revisión de literatura</b> .....4
2.1.	Antecedentes.....4
2.2.	Bases teóricas de la investigación.....13
<b>III.</b>	<b>Hipótesis</b> .....31
<b>IV.</b>	<b>Metodología</b> .....32
4.1.	Diseño de la investigación .....32
4.2.	Población y muestra .....33
4.3.	Definición y operacionalización de variables e indicadores .....36
4.4.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....37
4.5.	Plan de análisis .....44
4.6.	Matriz de consistencia .....45
4.7.	Principios éticos .....47
<b>V.</b>	<b>Resultados</b> .....49

5.1. Resultados .....	48
5.2. Análisis de resultados.....	54
<b>VI. Conclusiones .....</b>	<b>58</b>
6.1. Conclusiones.....	58
6.2. Recomendaciones.....	59
Referencias bibliográficas.....	60
Anexos.....	67

## 7. Índice de gráficos, tablas y cuadros.

### LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Efecto antibacteriano, <i>in vitro</i> , de los tres tipos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	<b>48</b>
<b>Tabla 2:</b> Efecto Antibacteriano, <i>in vitro</i> , de la recolección de raspado con espátula metálica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	<b>49</b>
<b>Tabla 3:</b> Efecto Antibacteriano, <i>in vitro</i> , de la recolección de raspado con espátula plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	<b>50</b>
<b>Tabla 4:</b> Efecto Antibacteriano, <i>in vitro</i> , de la recolección de malla plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	<b>51</b>
<b>Tabla 5:</b> Comparación del efecto antibacteriano, <i>in vitro</i> , de los tipos de recolección Raspado Metálico, Raspado Plástico de extractos etanólicos de propóleo al 30% y Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	<b>52</b>

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Comparación del efecto antibacteriano, <i>in vitro</i> , de los tipos de recolección Raspado Metálico, Raspado Plástico de extractos etanólicos de propóleo al 30% y Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	<b>53</b>
--	-----------

## **I. Introducción.**

La enfermedad bucal más prevalente es la caries dental, es importante conocer los agentes etiológicos que la ocasionan para así poder erradicarla <sup>1,2</sup>. Existen muchas investigaciones sobre los agentes bacteriostáticos que pueden actuar a nivel de los microorganismos que la desarrollan, pero es necesario realizar más investigaciones con bacteriostáticos de origen natural, como es el propóleo. <sup>1,3</sup>

Las abejas elaboran una sustancia resinosa que se origina de los exudados vegetales, llamado Propóleo.<sup>4,5</sup> Estudios anteriores han evidenciado que tiene diversidad de compuestos químicos, su composición es variable y esto depende del lugar que procede<sup>1,4</sup>. Los compuestos fenólicos son los más importantes, componen más de la mitad del peso total. Sus propiedades medicinales se deben a estas sustancias, pero sus propiedades antimicrobianas son ofrecidas por los flavonoides, el primordial compuesto fenólico del propóleo.<sup>4</sup>

La gran variedad de compuestos fenólicos que presenta el propóleo es lo que hace que el mecanismo de la actividad antimicrobiana sea compleja.<sup>4</sup>

El origen botánico del propóleo, la raza de la abeja, el tiempo en el que fue producido y el método de recolección del propóleo, es lo que hace cambiar su composición. <sup>1,6,7,8</sup> Con respecto a los métodos de recolección, existen referencias en donde nos muestran que hay diversos métodos de recolección de propóleo pero los más usados son, el método tradicional de raspado y el uso de

mallas o trampas plásticas.<sup>8</sup> En el tradicional método de raspado se obtiene propóleo con impurezas y contaminantes, los cuales pueden venir del ambiente o de la cosecha. Por otra parte, en el método con malla plástica se consigue un propóleo de superior calidad, con menos impurezas y sin contaminantes.<sup>5</sup>

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano, *in vitro*, de tres métodos de recolección de extractos etanólicos de propóleo (raspado con espátula metálica, raspado con espátula plástica y malla plástica) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Hoy por hoy el propóleo ha despertado un gran atractivo en científicos de todo el mundo, ya que ha mostrado una potente actividad biológica, desde el punto de vista terapéutico y nutricional, este proyecto ayudaría a mejorar la calidad del propóleo obtenido, saber por medio de que método de recolección sería el perfecto para que no intervenga en su composición y pueda producir un efecto antibacteriano eficaz.

Para este estudio se utilizó un propóleo de las colmenas ubicadas en el caserío el Porvenir, provincia de Otuzco, departamento de La Libertad, producido durante 3 meses. Para la obtención del extracto etanólico de propóleo se usaron las instalaciones del laboratorio de farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo y se usó el laboratorio de inmunología de la Universidad Nacional de Trujillo. Se agruparon los extractos según el método de recolección: método de raspado con espátula metálica, método de raspado con espátula plástica y método de malla plástica. Por cada método de recolección, se enfrentaron concentraciones al 5 %, 10 % y 30% con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mediante la técnica de Kirby-Bauer, para evaluar si existe diferencia

significativa en el efecto antibacteriano. Según la prueba de comparación de medias utilizando la distribución t de Student, se encontró diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) a la concentración de 30% entre el método de raspado con espátula metálica y raspado con espátula plástica. Este último método presentó el mayor halo de inhibición (1.28 cm). Se concluyó que el método de raspado con espátula tiene mayor efecto antibacteriano.

## II. Revisión de la literatura.

### 2.1. Antecedentes.

Checalla C. <sup>9</sup> (Tacna, Perú, 2020). “Efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *in vitro*, Tacna 2020”. Tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) frente a *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175, mediante un estudio, *in vitro*, en 2020. El presente estudio tuvo un diseño experimental porque se utilizó técnicas de cultivo en inoculados con cepas de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175 a los cuales se les aplicó discos con diferentes concentraciones de Extracto Etanólico de Propóleo (EEP). El EEP se obtuvo por maceración en alcohol al 70% durante 19 días, este EEP fue diluido con alcohol para obtener concentraciones de 25%, 50% y 75%. Utilizó la prueba de difusión en disco sobre el medio Brain Heart Infusion Agar (BHA) inoculado 8 placas con *S. mutans* ATCC 25175, empleándose como control positivo la clorhexidina (CHX) al 0,12%. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Finalmente utilizó el compás Vernier para realizar la medición de los halos de inhibición. Como resultados, se logró comprobar que existe efecto antibacteriano, por método de difusión Kirby Bauer demostrando que el extracto etanólico de propóleo presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (25% = 17.583 mm; 50% = 16.905 mm; 75% = 16,881 mm) ( $p < 0,05$ ).

Huaytalla R, et al. <sup>10</sup> (Lima, Perú, 2018). “Efecto inhibitor *in vitro* del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*”. Tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 15 % y 30% en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,12% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. El presente estudio fue de tipo experimental *in vitro*, mediante el método de difusión en disco placa, llamada también el método de Kirby-Bauer. La población estuvo conformada por cepas de *Lactobacillus acidophilus* de uso comercial, con una muestra de 30 cultivos en placas petri con agar base sangre, colocándose discos de papel Whatman N° 40 embebidos con extracto etanólico de propóleo al 15% y 30%, así como gluconato de clorhexidina 0,12% como control positivo y alcohol de 70° como control negativo. Se desarrolló el cultivo en condiciones de anaerobiosis a 37 °C. Como resultado, se demostró que la concentración al 15% y 30% del extracto etanólico de propóleo presenta un mayor efecto inhibitorio promedio de 8,15 mm y 11,75 mm a las 48 horas y de 11,40 mm y 14,25 mm a las 72 horas, respectivamente; en relación con el halo de inhibición promedio producido por el gluconato de clorhexidina al 0,12% a las 48 y 72 horas, que fue de 6,55 mm y 8,00 mm. En conclusión, la investigación encontró que el extracto etanólico de propóleo al 30% obtuvo mayor efecto inhibitorio *in vitro* frente a la cepa de *Lactobacillus acidophilus* al cabo de 48 y 72 horas cuando se le comparó con el gluconato de clorhexidina al 0,12%.

Cayo C, et al. <sup>11</sup> (Huacho, Perú, 2016). “Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del Propóleo sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)”. Evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del Propolis en el

crecimiento de cepas del *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Tuvo un diseño experimental *in vitro*, de tipo aplicada, transversal, prospectivo, y de nivel descriptivo. La población muestral estuvo conformada por 30 sembrados *Streptococcus mutans* de placas contenidas de Agar Müller Hinton. Para la cual se usaron concentraciones de 10%, 20% y 30% de Propolis y se midieron los halos de inhibición formados alrededor de los discos embebidos con cada una de las concentraciones sobre las cepas del *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Como resultado se obtuvo que para el grupo 1 (10%), la media aritmética fue de 0.486 mm. Para el grupo 2 (20%), la media aritmética fue de 0.714 mm. Y en el grupo 3 (30%), se obtuvo la media aritmética de 0.636 mm. En conclusión, este trabajo se demostró que los valores promedios de inhibición de los halos de los tres grupos, presentan alta dispersión. Además, los grupos comparados no presentan diferencia estadísticamente significativa, es decir los tres grupos tienen valores de inhibición del halo similares. Finalmente, la concentración inhibitoria mínima entre los tres grupos es la de concentración del propóleo al 10%.

Arévalo C. <sup>6</sup> (Trujillo, Perú, 2014). “Efecto antimicrobiano *in vitro* de tres variedades de própolis frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175”. Tuvo como objetivo determinar el tipo de Própolis *in vitro* que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El estudio fue de tipo prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental. Tuvo una muestra de 16 placas Petri. Donde se incluyó tres tipos de Própolis obtenidos de la parte costa de la Región de La Libertad, Chepen (tipo A), de la Región de San Martín, Moyobamba (tipo B), y de la Región de Ayacucho (tipo C). Se preparó

extractos etanólicos de Própolis al 10%, los cuales fueron embebidos en discos de papel filtro Whatman número 3 previamente esterilizados, posteriormente los discos fueron aplicados en el medio de cultivo Müller Hinton- sangre inoculados previamente con *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se incubó por 24 y 48 horas, y se tomó la medida del halo de inhibición. Se obtuvieron como resultados las medidas de halo de inhibición a las 24 horas para el tipo A (13.91 mm), tipo B (7.38 mm) y tipo C (14.50 mm) y a las 48 horas en el tipo A (17.06 mm), tipo B (7.88 mm) y tipo C (23.69 mm) de media. Mediante el test estadístico de Kruskal-Wallis se demostró que hay una diferencia de actividad entre las muestras a las 24 y 48 horas, obteniendo 32.604 mm y 42.164 mm, respectivamente, la cual se detalló mediante la prueba de Mann-Whitney donde se obtuvo que a las 24 horas el tipo de Própolis A y C no se diferencian entre sí, pero si se diferencian de B, obteniendo las dos primeras mejores resultados. A las 48 horas los tres tipos de Própolis se diferencian entre sí, siendo el tipo C el que obtuvo mejores resultados seguidos de A y de B, todo esto en cuanto a la medición de los halos de inhibición.

Barrientos L, et al. <sup>12</sup> (Chile, 2013). “Caracterización química y botánica del propóleo chileno y actividad biológica sobre bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*”. Su objetivo fue determinar la caracterización química y botánica de las muestras de propóleos chilenos y evaluar su actividad biológica contra las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Veinte muestras de propóleos se obtuvieron de los productores apícolas de las regiones central y sur de Chile. Los extractos concentrados de etanol y metanol (EEP) se prepararon con 30 g de propóleo

fresco picado, que maceraron durante 7 días a temperatura ambiente, tapados con etanol (70%) en matraz aforado (100 mL) y agitado ocasionalmente, todos los días, y finalmente, filtrado con Papel Whatman N° 2. Los extractos metanólicos se centrifugaron tres veces para eliminar las ceras. Todos los extractos fueron almacenado en la oscuridad a -20 ° C hasta el análisis. Las bacterias fueron muestras clínicas obtenidas de niños de la Región de La Araucanía aislados en un estudio previo y confirmados por PCR-RFLP. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó mediante microdilución, que consiste en realizar diluciones seriadas del compuesto a estudiar en microplacas (96 pozos) con caldo de soja tríptico. El inóculo de partida fue de  $5 \times 10^5$  ufc / ml. La CMI se determinó por triplicado para cada propóleo contra cepas bacterianas aisladas y se evaluó después de 48 h de incubación a 37 ° C. El análisis de los datos se realizó mediante el programa GraphPad Prism, versión 5.0 (EE. UU.) y el programa ANOVA se utilizó para las comparaciones de actividad antimicrobiana del propóleo. Las comparaciones entre las muestras (por triplicado) se realizaron con Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett's. El nivel de significancia estadística considerado fue  $p < 0.05$ . Como resultados, El EEP P001 y P008 del centro de Chile mostraron los niveles más bajos de actividad antimicrobiana (CMI 6,67 y 8,22, respectivamente). Similar, destacando el propóleo P019 y P020, del sur de Chile mostró la mayor actividad antimicrobiana (CMI 1,94 y 0,90, respectivamente). Al comparar el CMI para *S. mutans* y *S. sobrinus* según el origen, observamos para ambos que la CMI era más baja con propóleos del sur ( $p = 0,011$  y  $p = 0,007$ , respectivamente). Se concluyó que las diferentes muestras de propóleos no tienen la misma

actividad inhibidora sobre el crecimiento bacteriano, pero todos inhibieron el crecimiento de los *estreptococos mutans*.

Martínez J. <sup>5</sup> (Colombia, 2012). “Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección” Su objetivo fue evaluar la composición química y la actividad antimicrobiana de los propóleos provenientes del municipio de Caldas (Antioquia, Colombia), colectados en un mismo apiario por los métodos: tradicional de raspado y malla matrizada. Las muestras se colectaron en época de verano, durante los meses de junio-julio de 2007, por los métodos de raspado (CR) y malla plástica (CM) (malla flexible con orificio romboide de 3 x 3 mm) hasta obtener una muestra representativa del apiario y en cantidad suficiente para los análisis, las muestras se trituraron y homogenizaron. El material se almacenó bajo refrigeración y en ausencia de luz. Se pesaron 30 g de los propóleos crudos, los cuales se sometieron a extracción exhaustiva con etanol destilado del 96% (3 x 100 mL) durante 48 h a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Seguidamente, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se filtró por gravedad. Al filtrado obtenido se le adicionó 10 mL de agua destilada y se dejó en refrigeración hasta precipitar las ceras (12 h, aproximadamente). El ciclo de refrigeración se repitió hasta no observar ceras precipitadas. Después de filtrar, el extracto etanólico se sometió a un proceso de evaporación al vacío y temperatura de 40°C, hasta sequedad. La resina obtenida fue envasada en viales ámbar y refrigerada a -12°C hasta posterior utilización. La actividad antibacteriana se evaluó por el método de difusión en

disco en agar Mueller-Hilton inoculado con la cepa indicadora correspondiente. En la superficie del agar se depositaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro y tamaño de poro de 100  $\mu\text{m}$  previamente esterilizados. Los discos fueron impregnados con 20  $\mu\text{L}$  de la solución etanólica del propóleo y las cajas incubadas durante 18 h a 37°C. La actividad se expresó como la diferencia, en milímetros, entre el radio del halo de inhibición y el radio del disco de papel filtro. Adicionalmente, se realizó un control conteniendo sólo etanol. Las cepas indicadoras utilizadas fueron: *Salmonella tify*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, obtenidas del laboratorio de Microbiología Industrial de la Universidad Nacional de Colombia. Todas las cepas fueron recuperadas en medio BHI a 37°C por 24 h. Como resultado, para *S. aureus* en CM (0.1 mg/mL = 2.00  $\pm$  0.58 mm; 1 mg/mL = 2.00  $\pm$  1.53 mm; 10 mg/mL = 5.00  $\pm$  1.15 mm) y en CR (0.1 mg/mL = 3.00  $\pm$  0.58 mm; 1 mg/mL = 3.00  $\pm$  0.58 mm; 10 mg/mL = 3.00  $\pm$  0.58 mm), para *B. subtilis* solo obtuvo resultados en CM y a 10 mg/mL = 9.00  $\pm$  0.58 mm, para *E. Coli* en CM (0.1 mg/mL = 3.00  $\pm$  1.53 mm; 1 mg/mL = 6.00  $\pm$  0.58 mm; 10 mg/mL = 6.00  $\pm$  1.15 mm) y en CR (0.1 mg/mL = 6.00  $\pm$  1.00 mm; 1 mg/mL = 6.00  $\pm$  1.15 mm; 10 mg/mL = 5.00  $\pm$  0.58 mm) y para *S. tify* CM (0.1 mg/mL = 4.00  $\pm$  0.58 mm; 1 mg/mL = 5.00  $\pm$  0.00 mm; 10 mg/mL = 5.00  $\pm$  0.58 mm) y en CR (0.1 mg/mL = 5.00  $\pm$  1.00 mm; 1 mg/mL = 5.00  $\pm$  0.00 mm; 10 mg/mL = 6.00  $\pm$  0.58 mm). El material obtenido mediante malla matrizada presentó un perfil químico amplio, buena actividad antimicrobiana y mejores parámetros de calidad, de acuerdo con estándares establecidos por normas internacionales que los propóleos obtenidos por el método de raspado. Además, pudo observarse

que la acción antimicrobiana de los propóleos fue dependiente de la concentración del extracto y del hongo o bacteria evaluada.

Mayta-Tovalino F, et al. <sup>2</sup> (Lima, Perú, 2010). “Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)” Tuvo como objetivo determinar la acción antibacteriana del extracto etanólico de propóleo (EEP) de Oxapampa - Perú frente a dos cepas de microorganismos de la cavidad oral como el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus mutans*. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de Kirby-Bauer. El diseño del estudio fue de tipo experimental *in vitro* y el tamaño muestral fue 16. Se prepararon dos extractos de propóleo al 10% y al 30%. Para el análisis de la actividad antimicrobiana del EEP, los discos con EEP al 10% y 30% fueron colocados en placas petri estériles conteniendo el agar nutriente específico para cada cepa, incubadas a 37°C, por 24 y 48 horas, la actividad antimicrobiana fue determinada por la formación del halo inhibitorio alrededor de los discos medida mediante una regla vernier, el cual, nos determinó la cantidad en milímetros del diámetro del halo de inhibición. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba t de Student. Al analizar la acción antibacteriana contra el *S. mutans* de los EEP, se encontró que el propóleo al 10% presentó una media de 11,47mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,57 mm mientras que el propóleo al 30% presentó una media de 11,57mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,97. Al comparar se encontró que el diámetro del halo de inhibición contra el *S. mutans* de las dos concentraciones

de propóleo no mostraron diferencia significativa. Concluyeron que el EEP al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano que el Listerine® contra el *S. mutans*  $p < 0,001$  e igual en efectividad que la clorhexidina 0,05% frente al *S. aureus*.

Ophori E, et al. <sup>13</sup> (Nigeria, 2010). “Actividad antimicrobiana del propóleo contra *Streptococcus mutans*”. Su objetivo fue investigar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo (EEP) obtenido de colmenas de abejas (*Apis mellifera*) contra *Streptococcus mutans* aislado de caries dental. Las determinaciones de la difusión de agar y de la concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron los métodos utilizados en este estudio. El diente cariado se limpió con un algodón esterilizado e inmediatamente se rayó el agar triptona de soja, incubado a 37 ° C durante 48 - 72 h. *S. mutans* fue caracterizado por cultivos estándar, métodos morfológicos y bioquímicos. Se hicieron varias diluciones de EEP (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 y 32 µg/ml), mientras se utilizaron agua y etanol como controles. El EEP en concentraciones de 4, 8, 16 y 32 µg / ml mostró fuerte actividad antimicrobiana contra *S. mutans* con zonas de inhibición de  $10 \pm 4$ ,  $12 \pm 4$ ,  $20 \pm 2$  y  $24 \pm 2$  mm, respectivamente. Se obtuvo crecimiento en las placas Petri de *Streptococcus mutans* a concentraciones de 0.5, 1 y 2 µg / ml. Hubo un crecimiento medio a máximo de *S. mutans* en los controles de etanol y agua. Los resultados demuestran que el extracto etanólico de propóleo tiene una fuerte actividad antimicrobiana y sugieren que puede ser útil en el tratamiento de la caries dental causada principalmente por *S. mutans*. Se concluye que aparte del uso recomendado de pasta dental fluorada y algunos agentes antimicrobianos naturales, el uso del propóleo para el tratamiento y control de la caries dental es muy recomendable.

## **2.2. Bases teóricas de la investigación.**

### **2.2.1. Caries dental:**

Existen múltiples definiciones sobre la caries dental:

Según la Organización Mundial de la Salud, es un proceso dinámico consecuencia de un disturbio del equilibrio entre la superficie del diente y el fluido de la biopelícula circundante de tal modo que, en el tiempo, el resultado neto puede ser una pérdida de mineral de la superficie dental.<sup>15</sup>

“Es la destrucción o rompimiento de los dientes, en el cual hay una ruptura del tejido que configura el diente como el esmalte, dentina y cemento, que se crea por la acción de las bacterias en la superficie dental” (Silverstone ,1985)<sup>16</sup>

“Es una enfermedad que tiene múltiples factores causales, universal, que se distingue por la disolución química localizada, de los tejidos duros del diente por la acción de los ácidos orgánicos, provenientes del metabolismo bacteriano de azúcares” (Thylstrup,1998)<sup>16</sup>

“Enfermedad multifactorial, que posee algunos aspectos etiológicos, lo cual tendrá influencia en su prevención y tratamiento futuro” (Bordini, 2010)<sup>16</sup>

“Proceso de desmineralización que se produce en los dientes, por el ácido bacteriano, que se inicia debajo de la superficie dental”. Citó a Miller 1890 quien llegó a la conclusión de que “la caries dental es el resultado de la descalcificación producida por el ácido de las bacterias presentes en la cavidad oral; seguida de la colonización y destrucción de los tejidos del diente. Es una

de las enfermedades que se presenta con frecuencia y continuará siendo una causa importante de pérdida de dientes” (Henostroza, 2007) <sup>16</sup>

La patología bucal más prevalente es la caries dental, enfermedad infecto-contagiosa, transmisible y que puede alcanzar a involucrar la vitalidad del órgano pulpar. Es multifactorial, caracterizada por la destrucción de los tejidos duros del diente como resultado de una desmineralización incitada por los ácidos que origina la placa bacteriana a partir de los hidratos de carbono de la dieta, produciendo una cavidad conocida como caries. <sup>17</sup>

#### **Etiología de la caries dental:**

Enfermedad multifactorial de modo que hay diversas teorías al respecto. Negroni (2009) señaló “la existencia de tres factores que participan en la creación de caries dental, que figuran la triada de Keyes: un factor es el microorganismo que frente a un factor sustrato, logra afectar a un tercer factor el hospedador, que sería el diente. Asimismo, demostró que se necesita que pase un periodo de tiempo notable para la creación de procesos cariosos, por ende, forma parte de los factores de riesgo”. <sup>16</sup> La intervención de los tres factores deben actuar simultáneamente: por una parte, las características del huésped en general, es decir, el diente que debe ser susceptible a sufrir caries; por otro, la existencia de una microflora característica (en especial, *Streptococcus mutans*) y, en último lugar, la presencia de un sustrato compuesto, básicamente por la

existencia en la dieta de hidratos de carbono, en un periodo de tiempo concreto.<sup>17</sup>

Varios autores, indican que hay factores moduladores, quienes colaboran e influyen decisivamente en la aparición y desarrollo de las lesiones cariosas, ellos son: tiempo, edad, salud general, fluoruros, grado de instrucción, nivel socioeconómico, experiencia pasada de caries, grupo epidemiológico y variables de comportamiento.<sup>15</sup>

Shafer (1986), alegó “se hallan grupos de microorganismos predominantes dentro de la placa dental siendo estos los estreptococos (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis* y *S. salivarius*), actinomicetes (*A. viscosus*, *A. naeslundii*, *A. israelii*) y veillonellae (*V. parvula*, *V. alcalescens*), observando al *Streptococcus mutans* como el factor etiológico fundamental en la caries dental”.<sup>16</sup>

### **2.2.2. Grupo *Streptococcus mutans*:**

El *Streptococcus mutans*, es una bacteria coco Gram positivo dispuesto en cadena, catalasa negativo, fermentador de glucosa, sacarosa, fructosa, rafinosa, lactosa, manitol, inulina y salicina con producción de ácido láctico, acético, propiónico y fórmico, que colaboran a la desmineralización del diente, puesto que los ácidos elaborados por dicha bacteria se orientan hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando iones de hidronio, quienes disuelven inmediatamente el esmalte dental, haciendo calcio y fosfato, elementos que se dirigen al exterior del esmalte creando la desmineralización.<sup>18,19</sup> Es un microorganismo no móvil,

anaerobia facultativa, perteneciente al grupo viridans.<sup>6,18</sup> Tiene la facultad de variar un pH de 7 a 4.2 en 24 horas aproximadamente. Para un buen aislamiento e identificación, se necesita de medios de cultivos enriquecidos con sangre.<sup>18</sup>

El *Streptococcus mutans* fue descrito por primera vez por Clarke en 1924 pero recientemente ha aumentado el interés por esta especie que parece estar compuesta por un grupo de seis especies distintas o que al menos comparten cierto número de características comunes y que en la actualidad se conocen como *Streptococcus* del grupo *mutans*. Entre el grupo la especie más prevalente en el mundo es la descrita originalmente como *S. mutans* (serotipos c, e y f). Estos microorganismos se encuentran en un nivel del 90% en los portadores de *Streptococcus* del grupo *mutans*.<sup>19</sup>

Los *Streptococcus mutans* son cocos Gram+, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos, los cuales miden de 0.5 a 0.8 µm de diámetro. Esta bacteria se aísla en el 70 – 90% de la población no desdentada. Por su especial capacidad de colonizar superficies duras se aísla en la cavidad oral, sobre todo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva.<sup>6</sup>

- **Factores de patogenicidad:**

El *Streptococcus mutans* se encuentra normalmente en el biofilm dental pero bajo ciertas condiciones puede volverse dominante, lo que lleva a la progresión de la caries dental.<sup>3</sup>

Según Núñez (2010), “el *Streptococcus mutans*, es un microorganismo que tiene diferentes factores que incitan a la formación de caries, los cuales son: Acidogenicidad, que es la facultad del *Streptococcus* para

producir ácido láctico, como resultado de la fermentación de azúcares de la dieta y así desmineralizar el esmalte. Aciduricidad, que es la capacidad de elaborar ácido aún en medios con pH bajo. Acidofilicidad, que es la habilidad de tener alta resistencia a un medio con gran acidez, gracias a su capacidad de bombear protones fuera de la célula”<sup>6,18</sup>

El *Streptococcus mutans* sintetiza las glucosiltransferasas (GTF), son enzimas que elaboran glucanos libres desde la fermentación de la sacarosa.<sup>16,17</sup> Debido a los glucanos insolubles, el *Streptococcus mutans* se fija al diente y consigue su mantenimiento. El *Streptococcus mutans* posee una alta facultad de coagregación, ya que se puede unir fácilmente con diferentes especies y con otros *Streptococcus*, reforzando el biofilm oral.<sup>18</sup>

- **Medios de cultivo:**

Es una técnica de laboratorio usado en general para estudios científicos porque coopera a la multiplicación, crecimiento y desarrollo de un microorganismo *in vitro*. Un medio de cultivo debe estar estéril, incluir nutrientes específicos y tener la humedad correcta, para que se pueda emplear en el laboratorio de manera adecuada. La mayoría de medios de cultivo para una correcta utilización ya están deshidratados o liofilizados.<sup>18</sup>

El *Streptococcus mutans* en función del medio de cultivo y del producto patológico se muestra morfológicamente como cocos gram positivos que se agrupan en parejas y cadenas cortas o largas.<sup>19</sup> En medios de cultivo sólidos se aparecen conformando colonias pequeñas, redondeadas, ligeramente convexas y opacas, son como diminutas cadenas cortas. En medios

de cultivos líquidos la figura que mostrará será granulosa, conformando unos grupos que tienden a sedimentar en el fondo de los tubos, al medio ambiente perecen de 3 a 5 días y en caldo duran 8 días.<sup>16</sup>

- **Agar Muller Hinton con sangre**

Es un medio de cultivo usado para hacer pruebas de sensibilidad a extractos vegetales o diversos antimicrobianos para estudios científicos. Sólido, no selectivo, nutritivo que tiene concentraciones bajas de tetraciclinas, sulfonamidas y trimetoprima. Cuando al Agar Muller Hinton se le agrega 5% sangre de cordero, se pueden realizar ensayos de sensibilidad muy satisfactorias de *Streptococcus*.<sup>18</sup>

Su elaboración es de uso profesional. Se utiliza a menudo para cribar muestras contra una serie de microorganismos y el parámetro de actividad es el diámetro de la zona de inhibición.<sup>20</sup> En su método tiene peptona ácida de caseína, almidón, infusión de carne, agar. Debe preservarse en placas Petri a temperatura de 2 a 8°C, cuando se utiliza con sangre tiene un color rojo cereza. Su tiempo de incubación es variable según el microorganismo a investigar.<sup>18</sup>

### **2.2.3. Propóleo:**

El propóleo es una sustancia natural producida por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), desde diferentes tejidos de las plantas y los exudados de las

cortezas. Los materiales colectados son molidos, humectados y combinados con la cera creada por las glándulas ceras y por último son llevados hacia la colmena. En estado fresco es resinoso, y cuando se mantiene durante más de cinco meses en la colmena tiene forma vidriosa.<sup>5</sup> Tiene olor dulce. Es una sustancia gomosa, resinosa, quebradiza y dura. A más de 15°C, se ablanda y se torna pegajosa, y a más de 60 o 70 °C se torna líquida. Es originada en las yemas y cortezas de los arbustos o árboles y es recolectada por las abejas, quienes lo transforman con sus secreciones salivales y ceras, lo usan para cubrir los agujeros y así ir protegiendo su colmena contra microorganismos agresivos.

21

Se produce con el objetivo de defender la colmena, trabaja como soporte estructural para cubrir rendijas y agujeros para regular la temperatura del interior de la colmena y evitar el ingreso de otros organismos, conserva la colmena libre de bacterias y hongos. Dentro de las colmenas pequeños vertebrados intrusos y los cadáveres de los insectos se momifican con propóleos, evitando el ataque por insectos necrófagos y el desarrollo de enfermedades infecciosas.<sup>5</sup>

El Propóleo está siendo producido a lo largo y ancho del mundo por las abejas melíferas, estas usan la flora que se encuentra alrededor de sus colmenas para elaborar este producto, sin embargo, la composición química podría variar de acuerdo a la flora.<sup>22</sup>

Es un remedio que se ha usado desde la antigüedad, para diferentes usos, pero sobre todo se ha utilizado como cicatrizante, antiséptico, antimicrobiano, entre otros usos, su efectividad es indiscutible.<sup>21</sup>

- **Etimología:**

Propóleo proviene del griego “Pro” que quiere decir defensa de; y “polis” que significa panal. <sup>11,16</sup>

- **Características:**

- **Aspecto:** Esferas, granos, briquetas. Dependerá del método de recolección utilizado.

- **Estructura:** No homogénea, espesa, existencia de impurezas de cera y mecánicas, tiene relación con método de recolección usado.

- **Color:** Pardo, verde oscuro, amarillo-verdoso, amarillo, pardo rojizo, pardo oscuro, hasta negro.

- **Consistencia:** Pegajosa cuando recibe temperaturas de más de 15°C y líquida a temperaturas entre 60 a 70 °C.

- **Olor:** Aromático, resinoso, indica la presencia miel y de aceites esenciales. Existen propóleos inoloros.

- **Sabor:** Insípido en pocas ocasiones, picante, mayormente amargo. <sup>11,16</sup>

- **Composición química:**

Su composición es compleja, cambia según las fuentes vegetales, las diversas regiones climática y geográfica.<sup>5,19</sup> Se han identificado aproximadamente 200 compuestos diferentes.

Resinas y Balsamos.....	50-55%
Cera.....	25-35%
Aceites	
Volátiles.....	10%
Polen.....	5%
Sustancias orgánicas y minerales.....	5%

6,21,22

El propóleo es abundante en aceites esenciales y bioflavonoides, asimismo de incluir aminoácidos, oligoelementos y vitaminas. Conformado por más de 250 distintas sustancias, y 50 principios biológicamente activos. Dentro de su composición se hallan sobre todo oligoelementos y aceites esenciales. Los oligoelementos intervienen en procesos vitamínicos, metabólicos y fermentativos además colaboran en la recuperación de estados anémicos.<sup>21</sup>

Además, está compuesto de resinas, vitaminas, bálsamos, aminoácidos esenciales, flavonoides 50% de compuestos fenólicos (encargados de la actividad antiviral), cumarinas, aldehídos aromáticos, ácidos aromáticos, triglicéridos fenólicos.<sup>6,21</sup>

Depende del origen, los propóleos están conformados de 30 - 60 % por ésteres, aldehídos fenólicos y polifenólicos, cumarinas y flavonoides. Justamente los flavonoides, entre los que sobresalen las flavonas, flavonononas, flavonoles, dihidroflavonoles; los que brindan las excelentes propiedades terapéuticas, como el efecto antibacteriano, antiviral, antiparasitario y coagulante.<sup>21</sup>

- **Aspectos en la elaboración del propóleo:**

La interrelación de los factores juega un papel importante en el éxito de la calidad del propóleo, los cuales son:

○ **Clima y Flora:**

Como el propóleo es un material producido desde los exudados y tejidos de diversa vegetación, su origen geográfico repercute en su estructura, ya que las fuentes vegetales cambian según la latitud y los pisos térmicos.<sup>21</sup>

○ **Raza de la abeja:**

El ambiente en donde se desenvuelve la actividad apícola y la raza de la abeja influye en su elaboración. Los híbridos africanizados y la raza caucásica de *apis mellifera*, producen más propóleo que otras razas, favoreciendo también si los apiarios se encuentran a más de 1000 m de altitud.<sup>21</sup>

Perelli en 2012, mencionó a los grupos de abejas que elaboran propóleo: “*Apis mellifera*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona Compressipes*”, aunque, diversos estudios revelan que los propóleos de las abejas que son de

procedencia europea muestran menor efectividad antimicrobiana que las abejas que son de procedencia africana (*Apis mellifera*).<sup>17</sup>

○ **Métodos de recolección:**

Existen diversos métodos de recolección o producción de los propóleos, los más usados son el raspado del material apícola y la utilización de mallas plásticas colocadas en la parte superior de la última alza.<sup>22</sup>

Para obtener una excelente recolección depende básicamente de la conducta de las abejas en la colmena. Se puede acelerar la elaboración y mejorar la calidad del propóleo si se altera las condiciones dentro de las colmenas usando diferentes dispositivos.<sup>22</sup>

En la selección del propóleos a cosechar, es importante tener en cuenta la ubicación del mismo en la colmena. El propóleos de la piquera ha perdido gran parte de sus propiedades por estar expuesto al medio ambiente, al aire y al sol. El propóleos del techo contiene en general demasiadas ceras, mientras que el del piso demasiadas impurezas. El propóleos depositado en las paredes internas de la colmena, laterales y cabezales de los cuadros posee una mayor concentración de resinas y si bien se encuentra más protegido, es mucho más escaso.<sup>7</sup>

El método de recolección puede afectar la producción de propóleos en las colmenas y, dependiendo del estímulo para la recolección de resina por parte de los recolectores, puede agregar un exceso de cera de abejas al propóleo, alterando así su composición.<sup>8</sup>

- **Raspado del propóleo.**

Se basa en raspar con una espátula o cualquier otra herramienta con corte, en todos los espacios de la colmena donde las abejas han depositado propóleo.<sup>5, 20</sup> Los cuadros (donde van alojados los panales en las colmenas móviles) son raspados uno por uno, quitando con cuidado el propóleo de la madera. Las tapas, las paredes de la colmena, los cubre panales, también se actúa de la misma manera. El raspado es un trabajo dificultoso para el apicultor, y muy pocos son los que la practican por el esfuerzo que se realiza. Cuando las colmenas tienen muchos años sin sacar el propóleos, luego de varias horas de un laborioso raspado se puede conseguir hasta 200 gr. por colmena. Por medio de este método de recolección según el tiempo que lleve en la colmena puede que pierda sus propiedades.<sup>21</sup>

Es un procedimiento desfavorable por la alta posibilidad de oxidación y contaminación de los compuestos bioactivos dada la existencia de metales en el material usado para el raspado, y además muy engorroso por la poca productividad.<sup>5</sup>

- **Colocación de rejillas.**

Método utilizado por los apicultores profesionales. Mayormente se usan dos tipos de rejillas: las de trenzado de nylon y la plástica, elaborada con troquel. Consiste en una placa perforada (espacios de 1,5 a 3 mm.) por donde las abejas no se pueden movilizar, de modo que, tienen la necesidad de cubrir los orificios para obstruir el acceso de posibles enemigos o de frío. Las rejillas se ubican sobre los panales de la colmena. La época donde las abejas recolectan

más propóleo es en otoño. Normalmente de 1 a 6 meses es el tiempo adecuado para quitar la rejilla de la colmena y se sustituye por una nueva. El proceso para cosechar es: colocar la rejilla en un congelador durante una hora, al bajar la temperatura del propóleo cambia su consistencia, después se sacuden sobre una superficie dura para que se separe. Con el uso de este método, se consigue un propóleo más puro, lleva pocas impurezas, y de mejor calidad. Además, a diferencia del obtenido mediante raspado, comprendemos que se obtiene un propóleo más fresco, ya que se comienza a elaborar desde el punto en que se instala las rejillas en las colmenas. Por medio de este simple método de cosecha se pueden alcanzar, al año, de 100 a 200 gr. de propóleo de primera calidad. Además, a las abejas les evitamos enfado al momento de la cosecha, y el apicultor usa menos tiempo y esfuerzo.<sup>5, 7, 22</sup>

El uso de mallas a su vez proporciona un propóleo más granulado, el cual favorece el proceso de extracción con solventes como el etanol.<sup>5</sup>

- **Mecanismo de acción antimicrobiana del propóleo:**

La compleja composición le confiere al propóleo capacidad antibacteriana, antimicótico y antiviral.<sup>22</sup>

Algunos estudios han reportado que ciertos flavonoides presentan actividad biológica contra microorganismos orales y mencionaron que el propóleo inhibe in vitro la actividad de la formación del glucano y la glucosiltransferasa demostrando la actividad antibacteriana contra el *Streptococcus mutans*. Y *Sobrinus*.<sup>22</sup>

**Cuadro 1. Propiedades y compuestos químicos del propóleo.**

<b>PROPIEDAD</b>	<b>COMPUESTO QUÍMICO</b>
Antimicótico	Pinocembrina, ácido acético y caféico
Antibacterial	Pinocembrina, Kaemferol y ácido caféico
Antiséptico	Ácido Benzóico
Antiviral	Ácido caféico, luteolina y quercetina
Antimutagénica	Ácido ferúlico, ácido cinámico y ácido coumárico
Citotoxicidad e inhibición de tumores	Ácido Caféico, fenetil ester, quercetina y crisina
Anestésico local	Pinocembrina
Antihemorrágico	Flavonoides
Curación de heridas	Ácidos Fenólicos y flavonoides
Efecto aglutinante	Ácido Ferúlico
Estimula la mitosis y aumenta la biosíntesis de las proteínas	Arginina
Curación de úlceras gastroduodenales	Luteolina, apigenina, pinocembrina y galangina
Histaminopectica	Quercetina
Antioxidante	Flavonoides, ácido caféico y fenetil ester
Antiinflamatorio	Flavonoides y ácido caféico
Espasmolítico	Quercetina y Kaempferide
Promueve el desarrollo de colágeno y elastina	Ácido Felúrico

Elaborado por: Vázquez, 2010.<sup>7</sup>

- **Uso en la odontología:**

El propóleo exhibe propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antifúngicas, antivirales y antiinflamatorias, no es tóxico y su dosis segura es de 1.4 mg / kg o 70 mg día para humanos.<sup>3,23</sup>

o **Actividad Anticariogénica:**

El potencial anticariogénico del propóleo se ha verificado en distintos estudios *in vitro* e *in vivo* se ha descubierto la reducción de la incidencia de caries y acumulación de placa dental; mencionando que hay dos mecanismos ligados con las propiedades antiplaca / anticariogénica como son la inhibición de la enzima glucosiltransferasa y la actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas.<sup>1, 16, 21</sup>

La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos (EEP) los más efectivos. La composición química del propóleo revela que los componentes farmacológicos activos más importantes son los flavonoides y varios compuestos fenólicos, terpenoides y aromáticos. Entre estos la apigenina (flavonoides) y el tt-farnesol (terpenoides) han demostrado tener las mayores propiedades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans*, basados sobre todo en su capacidad de inhibir las glucosiltransferasas y en su efecto bactericida; además, impiden la síntesis de glucanos y pueden influenciar en la composición química y microbiana de la placa dental. Varios estudios, aseguran que el efecto antibacteriano del propóleo sobre los *lactobacilos*, es muy reducido, actúa en caries de esmalte o

dentina de poca profundidad ya que no puede dispersarse en áreas profundas del diente.<sup>1, 16,21</sup>

○ **Actividad anestésica:**

Manara y col, sugieren la actividad anestésica del propóleo, donde indican que la solución de propóleo al 0,01%, usándola como solución anestésica es hasta cuatro veces tan eficaz como la procaína al 5%, y de 3 a 5 veces más eficiente que la cocaína, proponiendo que es un anestésico de superficie con un valioso poder penetrante y pudiendo ser utilizado en tratamientos estomatológicos e infiltraciones cutáneas. Un extracto alcohólico de propóleo al 50% también fue utilizado en el tratamiento de otitis crónica, donde el resultado anestésico se logró en aproximadamente 10 minutos.<sup>1,21</sup>

○ **Utilización en Periodoncia:**

Los resultados obtenidos del manejo del propóleo en el periodonto ha sido de gran satisfacción puesto que para casos de gingivitis crónicas y úlceras bucales recurrentes e inespecíficas, ha evidenciado tener actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, cicatrizante y anestésica; demostrando que colabora en el tratamiento periodontal. Otros estudios han evidenciado que tras el uso de soluciones de propóleo existe una recuperación más rápida y que aumenta también la respuesta inmune local debido a que tienen actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas de la placa supragingival. El propóleo en un proceso antiinflamatorio inhibe la síntesis de prostaglandinas y ayuda al sistema inmune promoviendo la actividad fagocitaria y estimulando la

inmunidad celular.<sup>1,15,19,21</sup> Además, se ha demostrado que la adición de propóleo a las pastas dentales y enjuagues bucales mejora su actividad antimicrobiana y disminuye la acumulación de placa en los márgenes y, por tanto, sería eficaz para el tratamiento de la gingivitis.<sup>23</sup>

○ **Utilización en Endodoncia:**

Actualmente se han usado distintos fármacos para la desinfección e irrigación del conducto radicular durante el tratamiento endodóntico, donde el hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) la mejor opción; sin embargo Tellería y cols aplicaron un propóleo acuoso al 22% como tratamiento pulporadicular y lo compararon contra el  $\text{Ca(OH)}_2$  observando que a los 21 días del tratamiento, el 82,2% (54/70) de los pacientes tratados con el propóleo acuoso al 22% mostraron sus conductos en condiciones de ser obturados, en contraste con el 85,7% (60/70) tratados con  $\text{Ca(OH)}_2$ , y a los 28 días del tratamiento el 92,8% (65/70) de los pacientes tenían sus conductos preparados para ser obturados sin tener casos con complicaciones o reacciones alérgicas al medicamento con respecto al 97,1% (68/70) del grupo control ( $\text{Ca(OH)}_2$ ); señalando que el Propóleo Acuoso al 22% es un producto eficaz en el tratamiento endodóntico debido a que sus resultados son parecidos a los obtenidos con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Al no afectar la coloración del diente, el propóleo figura una opción de tratamiento, y además el costo por paciente es muy bajo.<sup>1, 16,21</sup>

Da Silva G. en 2008, hizo una investigación comparando la actividad antibacteriana de 2 pastas de extracto de propóleo mezclado con hidróxido de calcio, concluyendo que las pastas con propóleo presentan más actividad

biocida frente a microorganismos de piezas dentarias con signos de necrosis y fistula.<sup>16</sup>

○ **Utilización en Cirugía:**

En cirugía oral se utilizó en heridas quirúrgicas (alvéolos) post extracciones dentarias, haciendo experimentos con una solución hidroalcohólica al 10% de propóleo y una solución hidroalcohólica pura empleados en alvéolos inmediatamente post extracción, valorando su efecto sobre la epitelización de las heridas y aceleración de la cicatrización post extracción dentaria, hallando efectos positivos.<sup>1, 14,19</sup> Asimismo, Quintana y col, hicieron una investigación en donde a diez pacientes con heridas sépticas faciales que poseían gérmenes patógenos, eritema, secreciones y en algún grado dehiscencia, se les colocó una tintura de propóleo al 5% en etanol, sin mandar antibioterapia en ninguna circunstancia. De estos pacientes seis presentaron traumatismos, tres pertenecieron a una exéresis de carcinomas basocelulares de piel, y a uno se le hizo una otoplastia. Como resultado se obtuvo que el tiempo de curación de las heridas fue de siete días para aquellos que tuvieron gérmenes Gram positivos. El tiempo de resolución de la injuria para un solo paciente que tuvo bacterias Gram-negativas, fue de trece días.<sup>1,21</sup>

En el tratamiento de úlceras bucales, el propóleo ha demostrado la cicatrización rápida y la reducción del dolor. Igualmente se confirma las propiedades antiinflamatorias, hemostáticas y antibacterianas del propóleo, estas ayudan a una mejoría en los tejidos y una recuperación posoperatoria más rápida en los pacientes intervenidos quirúrgicamente.<sup>21</sup>

### **III. Hipótesis:**

El extracto etanólico de propóleo obtenido por el método de recolección de malla plástica presenta mejor efecto antibacteriano que el obtenido por raspado frente a cepas de *Streptococcus mutans*.

## **IV. Metodología.**

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

Según la intervención del investigador es experimental porque se basa en manipulación de la realidad o del estado natural del objeto.<sup>25</sup>

Según su dimensión espacio-temporal es transversal ya que este estudio se realizó y midió solo una vez en un tiempo determinado.<sup>26</sup>

Según la comparación de las variables es comparativo porque es un procedimiento sistemático de contrastación de uno o más fenómenos, a través del cual se buscan establecer similitudes y diferencias entre ellas.<sup>26</sup>

Según la planificación de la medición de la variable de estudio es prospectivo por que el planteamiento de la dirección es progresivo (hacia delante) en el tiempo desde el momento en que se inicia el estudio.<sup>26</sup>

Según el número de variables de interés (analíticas) es analítico porque pretenden descubrir una hipotética relación entre algún factor de riesgo y un determinado efecto, es decir, pretenden establecer una relación causal entre dos fenómenos naturales.<sup>26</sup>

#### **4.2. Población y muestra:**

a) Población:

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

##### **a. Criterio de inclusión**

- Placas Petri que presenten el caldo de cultivo *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Placas Petri que se encuentren en buenas condiciones y esterilizadas óptimamente.

##### **b. Criterio de exclusión**

- Placas Petri que no hayan seguido el correcto proceso de esterilización.
- Cepas de "*Streptococcus mutans*" que no pertenezcan al grupo viridans.

a) Muestra:

Fue 100  $\mu$ l de una suspensión bacteriana obtenida a partir de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, esta suspensión fue equivalente a un tubo N° 0.5 (1.5 x10 UFC/ml) del nefelómetro de MacFarland.

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó la fórmula de comparación de medias.

$$n = \frac{\left(\frac{Z_{\alpha} + Z_{\beta}}{2}\right)^2 2s^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Donde: n: muestra preliminar  $n_f$ : muestra reajustada

$$\frac{Z_{\alpha}}{2} = 1.96 \text{ para una confianza del 95\%}$$

$$Z_{\beta} = 0.84 \text{ para una confianza del 80\%}$$

$s = 0.5 (X_1 - X_2)$  valor asumido por no haber estudios previos

Reemplazando:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 2 [0.5 (X_1 - X_2)]^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

$$n = 5$$

Se obtuvo una muestra de 5 repeticiones para cada método de recolección y concentración.

Se usaron un total de 15 placas para los grupos experimentales y 5 placas para los controles.

De cada método de recolección Tipo A, B y C, se realizaron 5 placas, en donde, dentro de cada una de ellas se colocaron las 3 discos Whatman número 3 en concentraciones 5%, 10% y 30%. También se realizaron 5 placas de control, donde se colocaron el control positivo (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%) y control negativo (agua destilada estéril).

### 4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores

VARIABLE	DEF. CONCEPTUAL	DEF. OPERACIONAL	INDICADORES	VALORES FINALES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA VALORATIVA
MÉTODOS DE RECOLECCIÓN	Procedimientos que se realizan para la recolección del propóleo de las colmenas. <sup>22</sup>	Para el estudio se considerará el método de recolección por raspado con espátula plástica y el método de recolección usando malla plástica.	Método empleado	Método raspado con metal Método raspado con plástico Método malla plástica	CUALITATIVA	NOMINAL
EFECTO ANTIBACTERIANO	Capacidad de producir la eliminación o inhibir el crecimiento de agentes patógenos como son las bacterias. <sup>17</sup>	Efectividad inhibitoria del crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) debido a la presencia de dos distintos extractos de propóleo.	Halo de Inhibición	cm.	CUANTITATIVA	DE RAZÓN

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

- Técnica: Observación
- Instrumentos: Calibrador o pie de rey

##### **4.4.1. De la obtención del propóleo:**

La procedencia del propóleo fue del caserío el Porvenir en la provincia de Otuzco en el departamento de La Libertad, por parte de un apicultor. Se usaron 4 colmenas para la investigación.

La obtención de las muestras de propóleos se recolectó mediante condiciones de higiene, por tres distintos métodos de recolección. Se limpiaron 4 colmenas antes de comenzar la producción de propóleo.<sup>21</sup> En 2 colmenas no se colocaron malla para que las abejas produzcan su propóleo en el alrededor de la colmena. En las otras 2 colmenas se colocaron una malla plástica semi-rígida de 430 x 500 mm; entre la última alza y el techo.<sup>22</sup>

Se tomó un tiempo de 3 meses para la recolección de propóleo.<sup>22</sup>

##### **- Metodología para la recolección y extracción del propóleos:**

Pasado el tiempo, se procedió a la cosecha de los propóleos. Los métodos de recolección utilizados en el trabajo de campo fueron:

##### **Método de raspado con espátula metálica:**

Consiste en raspar con palanca o con espátula metálica todos los lugares de la colmena en los cuales las abejas hayan depositado propóleo.<sup>7</sup>

En una colmena se procedió a raspar con espátula metálica todo el propóleo que se encontraba dentro de la colmena, entretapa y cuadros.<sup>5,8</sup>

**Método de raspado con espátula plástica:**

Consiste en raspar con palanca o con espátula plástica todos los lugares de la colmena en los cuales las abejas hayan depositado propóleo.<sup>7</sup>

En otra colmena se procedió a raspar con espátula plástica todo el propóleo que se encontraba dentro de la colmena, entretapa y cuadros.<sup>5,8</sup>

**Método de malla o trampa plástica:**

Las mallas o rejillas plásticas, se colocan entre los cabezales de los cuadros y la entretapa. Las mismas, son láminas con orificios o ranuras que las abejas rellenan con propóleos para evitar el enfriamiento del nido de cría. Esta disposición permite su fácil retiro y posterior recolección. Además, le permite a la abeja la tarea de propolizado sin alterar el funcionamiento natural de la misma. Posterior a su retiro, se congelan en un período que oscila de una a tres horas. Mediante una ligera presión sobre las mismas, se permite que los propóleos se desprendan de las ranuras.<sup>7,22</sup>

En las 2 colmenas que se colocaron malla plástica, (plásticas, matizadas de 52 x 42 cm, con 20 orificios/ cm<sup>2</sup> y 61,5 g de peso) sobre la última alza, entre los cabezales y la entretapa.<sup>5</sup>

**- Recolección:**

Se realizó en función del sistema de recolección de la muestra.

Para el método de raspado metálico y plástico se extrajo directamente el propóleo.<sup>5</sup>

Para el método de malla plástica se utilizó el siguiente proceso: se retiraron las rejillas llenas de propóleo y se colocaron en un congelador durante una hora, con el propósito de volver frágil y quebradizo al propóleo, así posteriormente se procedió a recoger el propóleo más fácilmente. <sup>5,22</sup>

El transporte se hizo por medio de frascos de vidrio color ámbar estériles, para llevarlo a su posterior procesamiento. El material se almacenó bajo refrigeración y en ausencia de luz, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

#### **4.4.2. De la preparación de los extractos:**

Antes de la preparación de los extractos, se procedió a eliminar las impurezas visibles que se encontraron en el propóleo, tales como virutas de madera, parte de abejas, restos vegetales. Luego fueron cortados en trozos pequeños y se pesaron con exactitud 50 g de cada una de las muestras de propóleo. Luego se vertieron por separado en cartuchos de papel de filtro Whatman N° 4 y se colocaron en el extractor del equipo de Soxhlet y se extrajeron con 200 mL de etanol de 70% a una temperatura de 60°C a 80°C durante 4 horas. Transcurrido el tiempo se procedió a filtrar al vacío con papel de filtro Whatman N° 2 y se concentraron cada uno de los extractos etanólicos en un rotavapor a presión reducida a una temperatura de 40°C. Los extractos etanólicos de propóleo se sometieron a secado en estufa a 40°C durante 2 horas, para obtener el denominado extracto blando total.<sup>6</sup>

#### **- De la determinación de la concentración del propóleo:**

A partir de este extracto se prepararon las concentraciones de 5 %, 10 % y 30% disueltos en etanol de 70 %. Cada una de las concentraciones fueron colocadas en frascos estériles de vidrio de color ámbar y se llevaron a refrigerar a 4°C hasta su posterior evaluación microbiológica.<sup>9,11</sup>

#### **4.4.3. De la preparación del inóculo:**

##### **- Reactivación de la cepa**

Para este estudio se utilizó cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

La reactivación se realizó sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI) o Cerebro Corazón Infusión, luego se incubó a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia.

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar TSYB e incubó en 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se escogió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar coloración gram.

La cepa se mantuvo en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), hasta su posterior utilización.<sup>6</sup>

##### **- Método de difusión en agar:**

La evaluación del efecto de los extractos de propóleo se realizó mediante el método de difusión en agar Kirby Bauer.

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

○ **Estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175:**

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mantenidos en Caldo BHI se sembraron en Agar TSA, se incubaron bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 24 horas, con el fin de obtener colonias jóvenes.

Luego de 24 horas cada colonia de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se diluyeron en caldo BHI hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland ( $1.5 \times 10^8$  bact./mL).<sup>6</sup>

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo ( $1 \times 10^8$  ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocaron en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para remover el exceso de inóculo.<sup>6</sup>

Se inoculó la superficie seca de 20 placas de Müeller Hinton, el hisopo se desplazó en una sola dirección asegurándose una distribución uniforme del inóculo. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial fuera absorbido.<sup>6</sup>

#### **4.4.4. De la prueba del efecto antibacteriano**

**- Aplicación del EEP:**

Inoculadas las placas de Müeller Hinton con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se prepararon discos de papel filtro Whatman número 3

estériles, los cuales fueron embebidos con 60 ul de EEP al 5%, 10% y 30%. Contábamos con tres EEP a los cuales se clasificaron como tipo A (Raspado Metal), tipo B (Raspado Plástico) y tipo C (Malla Plástica). Y de cada uno concentraciones al 5%, 10% y 30%

Con una pinza estéril, los discos fueron colocados sobre las placas de Müeller Hinton con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se colocaron 3 discos de papel filtro en cada caja Petri, conteniendo cada uno las concentraciones de 5%, 10% y 30% por cada método de recolección. Se inocularon 5 placas por tipo de propóleo. Además, se evaluaron control positivo (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%) y control negativo (agua destilada estéril). Estas fueron colocadas en una misma caja Petri con dos discos de papel filtro, uno con 60 ul de Gluconato de Clorhexidina al 0.12% y el último impregnado en agua destilada estéril. Se realizaron 5 repeticiones de los controles.<sup>6</sup>

#### **- Incubación:**

Se incubaron las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de las sustancias a evaluar. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas en microanaerofilia utilizando jarra Gaspak y con el método de la vela.

Después del tiempo de incubación 24 a 48 horas se examinaron cada placa y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco. <sup>6</sup>

**- Medición del efecto antibacteriano:**

La lectura e interpretación de los resultados del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo ante el *Streptococcus mutans*, se determinaron a través de la técnica de medición de los halos de inhibición que se formarán alrededor de cada uno de los discos colocados en las placas, previamente impregnados con las sustancias antimicrobianas seleccionadas para posteriormente medirlos, esta lectura se la realizó a las 48 horas; con la ayuda de un calibrador, el cual determinó las medidas de los halos en cm.

#### **4.5. Plan de Análisis:**

Los datos experimentales fueron ingresados en una base de datos en IBM SPSS Statistics 23, reportándose tablas de medidas de los halos de inhibición en cm.

Para analizar la información se construyó tabla de frecuencia de una entrada con sus valores absolutos, se calculará la media y desviación estándar.

Para determinar si hay diferencia del efecto antibacteriano del propóleo al 30% y el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se empleó la prueba de comparación de medias utilizando la distribución t de Student con un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ), previa verificación de la normalidad de los datos.

#### 4.6. Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Tipo de Investigación	Población y Muestra
¿Cuál es efecto antibacteriano, <i>in vitro</i> , de tres métodos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	<p><u>Objetivo General:</u> Determinar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, de tres métodos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p><u>Objetivos Específicos:</u> Evaluar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, de la recolección de raspado con espátula metálica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.  Evaluar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, de la recolección de raspado con espátula plástica del extracto etanólico de propóleo</p>	<p>El extracto etanólico de propóleo obtenido por el método de recolección de malla plástica presenta mejor efecto antibacteriano que el obtenido por raspado frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i>.</p>	<p>Métodos de recolección</p> <p>Efecto Antibacteriano</p>	<p><u>Método de la investigación:</u> Tipo: cuantitativa Nivel: aplicativo</p> <p><u>Diseño de la Investigación:</u> Transversal</p> <p>Comparativo</p> <p>Experimental <i>in vitro</i></p>	<p>Población: Una cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Muestra: Se realizaron un total de 15 placas de EEP y 5 placas de control. De cada método de recolección Tipo A, B y C, se realizaron 5 placas, en donde, dentro de ellas se colocaron las 3 concentraciones 5%, 10% y 30%. También se realizaron 5 placas de control, donde se</p>

	<p>sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Evaluar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, de la recolección de malla plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Comparar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, de los tres métodos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>				<p>colocaron el control positivo (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%) y control negativo (agua destilada estéril).</p>
--	--	--	--	--	--

#### **4.7.Principios Éticos:**

Para la investigación se consideraron los siguientes principios éticos:<sup>28</sup>

##### **Integridad científica:**

- Esta investigación se realizó con la ayuda de asesores quienes están totalmente identificados y competentes.
- Se garantizó la bioseguridad de los laboratorios, así como los conocimientos para la utilización de los equipos y el correcto manejo de los desechos.
- No existieron conflictos de intereses que influyan en los resultados del estudio.

##### **Justicia:**

- Se informó al apicultor y a los asesores de todos los resultados obtenidos en este proyecto.

##### **Cuidado del medio ambiente y la biodiversidad:**

- Se informó al apicultor que la cosecha del propóleo puede ser perjudicial para las abejas.
- Se procedió a la correcta eliminación de los microorganismos siguiendo los protocolos de desinfección del laboratorio.

## V. Resultados.

### 5.1. Resultados:

TABLA 1

Efecto antibacteriano, *in vitro*, de los tres tipos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Concentraciones de EEP	n	Raspado Metálico		Raspado Plástico		Malla Plástica	
		$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S	$\bar{X}$	S
5%	5	0	0	0	0	0	0
10%	5	0	0	0	0	0	0
30%	5	1.12	0.045	1.28	0.110	0	0

Fuente: Base de datos

**Interpretación:** Al determinar el efecto antibacteriano, *in vitro*, de los tres tipos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las concentraciones de 5% y 10% no presentaron efecto antibacteriano. Al 30% se obtuvieron resultados de una media de 1.12 cm para Raspado Metálico y 1.28 cm en Raspado Plástico.

TABLA 2

Efecto Antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de raspado con espátula metálica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Concentraciones de propóleo	n	Raspado Metálico	
		$\bar{X}$	S
5%	5	0	0
10%	5	0	0
30%	5	1.12	0.045

Fuente: Base de datos

**Interpretación:** Al evaluar el efecto antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de raspado con espátula metálica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, presentó efecto solo en la concentración de 30% con una media de 1.12 cm.

TABLA 3

Efecto Antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de raspado con espátula plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Concentraciones	N	Raspado	
		Plástico	
		$\bar{X}$	S
5%	5	0	0
10%	5	0	0
30%	5	1.28	0.110

Fuente: Base de datos

**Interpretación:** Al evaluar el efecto antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de raspado con espátula plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, presentó efecto solo en la concentración de 30% con una media de 1.28 cm.

TABLA 4

Efecto Antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de malla plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Concentraciones	n	Malla Plástica	
		$\bar{X}$	S
5%	5	0	0
10%	5	0	0
30%	5	0	0

Fuente: Base de datos

**Interpretación:** Al evaluar el efecto antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de malla plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, no presentó efecto antibacteriano en ninguna concentración.

TABLA 5

Comparación del efecto antibacteriano, *in vitro*, de los métodos de recolección Raspado Metálico, Raspado Plástico de extractos etanólicos de propóleo al 30% y Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

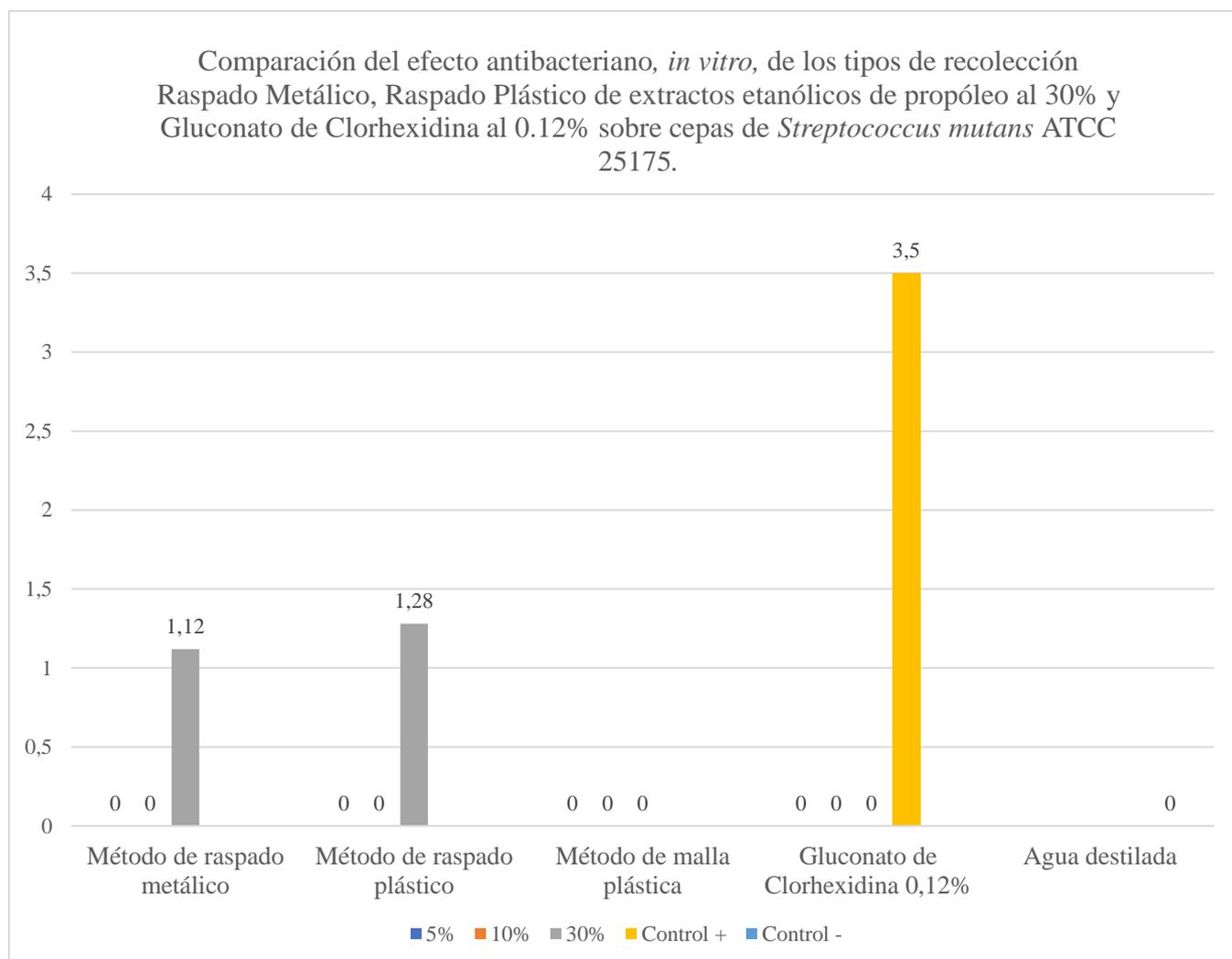
Comparaciones de los extractos según método	Halos de inhibición (cm)				T	p
	$\bar{X}_{(1)}$	S <sub>(1)</sub>	$\bar{X}_{(2)}$	S <sub>(2)</sub>		
<b>R. Metálico<sub>(1)</sub> vs R. Plástico<sub>(2)</sub></b>	1.12	0.045	1.28	0.110	3.0103	<0.01
<b>R. Metálico<sub>(1)</sub> vs G. de Clorhexidina 0.12%<sub>(2)</sub></b>	1.12	0.045	3.5	0	118.2631	<0.001
<b>R. Plástico<sub>(1)</sub> vs G. de Clorhexidina 0.12%<sub>(2)</sub></b>	1.28	0.110	3.5	0	45.1279	<0.001

Fuente: Base de datos

Prueba estadística: t de Student

**Interpretación:** Al comparar el efecto antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de raspado metálico con el de raspado plástico de los extractos etanólicos de propóleo, se encontró diferencia estadística. La clorhexidina tiene un mejor efecto antibacteriano, *in vitro*, que los extractos etanólicos de propóleo.

GRÁFICO 1



**Interpretación:** La gráfica de barras nos muestra que solo se obtuvo efecto antibacteriano, *in vitro*, del método de recolección de raspado metálico y raspado plástico de los extractos etanólicos de propóleo, ambos únicamente en la concentración de 30%. También se obtuvo un amplio halo de inhibición con el Gluconato de Clorhexidina 0.12% (control positivo).

## 5.2. Análisis de resultados.

Los resultados de este estudio muestran que el método de recolección influye en la actividad biológica y por ende en su composición. Es importante señalar que las abejas de este estudio se ubicaron en el mismo lugar y recolectaron resinas en la misma área; por lo tanto, estuvieron expuestos a las mismas condiciones climáticas y de suelo.

Se comparó el efecto antibacteriano, *in vitro*, de los tres métodos de recolección (método de Raspado Metálico, método de Raspado Plástico y método de Malla Plástica) de los extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Tabla 1). Solamente presentó efecto antibacteriano el tipo de recolección de raspado metálico y raspado plástico de los extractos etanólicos de propóleo, y a la concentración de 30%. Probablemente, no se encontró resultados en el método de malla plástica porque las abejas al encontrar un medio hecho de plástico, depositen más cera. Las colmenas usadas en este estudio nunca habían tenido contacto con un medio de plástico. Cuando un propóleo crudo tiene mucho contenido de cera es desfavorable, ya que ahí no se encuentran compuestos fenólicos ni flavonoides, los cuales son los principales compuestos bioactivos y por los que se le atribuye el poder antibacteriano.<sup>1,7,27</sup> Los flavonoides, varían según la zona de recolección por parte de las abejas, tienen un mecanismo de acción que está dado por la inhibición de la división celular, disrupción del ADN, desorganización de la membrana citoplasmática e inhibición de la síntesis de la pared celular, causando bacteriólisis parcial e inhibiendo la síntesis proteica.<sup>10</sup> Es posible también, que en los dos métodos de raspado las virutas de madera constituyan un elemento tóxico que incremente el efecto antibacteriano del propóleo. Estos resultados difieren a los estudios en donde se obtuvieron mejores

resultados en malla plástica, debido a que ciertas muestras obtenidas por el método de raspado presentan cantidades de cera algo superiores.<sup>27</sup>

A diferencia de Cayo C.<sup>11</sup> quien encontró efecto antibacteriano, *in vitro*, del propóleo sobre cultivos de *Streptococcus mutans* en tres concentraciones 10%, 20% y 30%, y como resultado se obtuvo efecto inhibitorio positivo en las tres concentraciones. Seguramente, se deba porque el propóleo utilizado para ese estudio tenga más presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en su composición, eso hace que presente un mayor efecto antibacteriano.<sup>7,27</sup> Puede también que el propóleo utilizado en esta investigación debido a la flora y la ubicación geográfica que existe en el distrito de Huacho (Perú) tenga mejores componentes antibacterianos. Sabemos que la composición química del propóleo es sumamente compleja, puesto que cada región presenta condiciones de flora diversa, dependiendo de los fenómenos locales, influenciados por la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa del ambiente y el brillo solar.<sup>27</sup>

Por otro lado, Martínez J.<sup>5</sup>, evaluó las propiedades físico-químicas del propóleo obtenido por dos métodos diferentes, raspado metálico y método de trampa plástica, sus resultados fueron que la muestra que más se ajustó a los parámetros de calidad internacional fue la recolectada por el método de malla plástica. Contrariamente, encontró efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo obtenido mediante trampa plástica, pero la bacteria enfrentada no fue *Streptococcus mutans*.

Comparando el efecto antibacteriano, *in vitro*, entre los dos tipos de raspado; el método con espátula metálica tuvo menor efecto (Tabla 1). Posiblemente, la presencia del metal al momento de la recolección disminuyó el efecto

antibacteriano.<sup>22</sup> También puede ser debido a la composición del propóleo que ha sido raspado ya que en distintas partes de la colmena tendrán diferente composición, se encuentra mayor porcentaje de compuesto fenólicos en el propóleo que recubre los panales, por lo que será muy difícil encontrar dos colmenas que produzcan propóleos idénticos aun cuando estén ubicadas en la misma zona geográfica, puesto que lo elaboran de acuerdo con sus necesidades y fuentes de materia prima disponibles.<sup>1</sup>

Los métodos de recolección que tuvieron efecto, solamente lo hicieron en concentraciones del 30%. Por el contrario, Mayta-Tovalino F.<sup>2</sup>, encontró efecto antibacteriano de extractos etanólicos de propóleo a concentraciones de 10% y 30%, sin mostrar una diferencia significativa entre estas dos concentraciones. Posiblemente se deba a la procedencia del propóleo, dado que lo obtuvo de la zona de Oxapampa, departamento de Pasco-Perú, mientras en el presente estudio se recolectó de la provincia de Otuzco, departamento La Libertad-Perú. También afecta la estación en la que es cosechado. La composición del propóleo varía según la región, el clima y las especies florales prevalentes,<sup>24</sup> teniendo mejores componentes antimicrobianos en la estación de invierno, cuando están presentes las lluvias y las abejas permanecen en las colmenas.<sup>19</sup> Este estudio se realizó entre los meses de Octubre 2016 y Enero 2017, fue en primavera-verano y no se presentaron lluvias.

Se encontró una diferencia altamente significativa ( $p < 0.001$ ) entre el efecto antibacteriano, *in vitro*, del extracto etanólico de propóleo al 30% con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12%; superando este último ampliamente al propóleo. Al igual que, Checalla C.<sup>9</sup>, encontró diferencia significativa entre el control positivo, la Clorhexidina al 0.12%, y el EEP al 25%, 50% y 75%. Probablemente sea porque

la Clorhexidina al 0.12% es altamente específica para la cepa utilizada en este estudio. Su mecanismo de acción es unirse a la membrana celular de las bacterias y producir un aumento de la permeabilidad.<sup>17</sup>

## VI. Conclusiones y recomendaciones.

### 6.1. Conclusiones:

- Se observó efecto antibacteriano, *in vitro*, de tres métodos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Se observó efecto antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de Raspado Metálico del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* solamente con la concentración de 30%.
- Se observó efecto antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de Raspado Plástico del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* solamente con la concentración de 30%.
- No se observó efecto antibacteriano, *in vitro*, de la recolección de Malla Plástica del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* a ninguna concentración.
- Se encontró diferencia muy significativa ( $p < 0.01$ ) del efecto antibacteriano, *in vitro*, entre los métodos de recolección de Raspado Metálico y Raspado Plástico del extracto etanólico de propóleo sobre la cepa de *Streptococcus mutans* a la concentración de 30%, siendo mayor el efecto antibacteriano en el Raspado Plástico. La clorhexidina tiene un mejor efecto antibacteriano, *in vitro*, que los extractos etanólicos de propóleo.

## **6.2. Recomendaciones.**

Se recomienda realizar más estudios sobre si los métodos de recolección influyen en el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de propóleo, para que puedan compararse con el presente estudio que obtuvo mejores resultados con el método de raspado plástico.

Para los interesados en trabajos de investigación de calidad de propóleos, se debe tener en cuenta que la zona y el tiempo en que es recolectado siempre variará, por ende es necesario hacer un análisis de cada muestra.

Para los apicultores, se recomienda realizar estudios de los propóleos producidos en las colmenas, para que puedan vender un producto de mejor calidad.

Realizar estudios con propóleo procedente de territorio nacional.

Fomentar el uso de productos naturales en cuidado de nuestra salud bucal.

## Referencias Bibliográficas.

1. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Villarreal J, Gonzáles A. Uso de propóleo en odontología. *Acta Odontológica Venezolana*. 2010; 48(2). [Citado 16 de Octubre 2020]  
Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art-23/>
2. Mayta-Tovalino F, Sacsquispe-Contreras SJ. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Rev Estomatol Herediana*. 2010; 20(1):19-24. [Citado 16 de Octubre 2020]  
Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4215/421539355004.pdf>
3. Djais A, Putri N, Putri A, Soekanto S. Description of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Candida albicans* biofilms after exposure to propolis dentifrice by using OpenCFU method. *Saudi Dental Journal*. 2020; 32: 129-134. [Citado 01 de Enero 2021]  
Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7063437/pdf/main.pdf>
4. Jara R. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus Sanguinis* (ATCC 10556) [Trabajo para optar el título profesional de cirujano dentista]. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2014. [Citado 16 de Octubre 2020]

Disponible en:

<https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/528160/Tesis%20Jara%20Mu%C3%B1oz.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Martínez J, García C, Durango D, Gil. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. Rev.MVZ Córdoba. 2012; 17(1):2861-2869. [Citado 16 de Octubre 2020]

Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/319606934\\_Caracterizacion\\_de\\_propoleos\\_provenientes\\_del\\_municipio\\_de\\_Caldas\\_obtenido\\_por\\_dos\\_metodos\\_de\\_recoleccion](https://www.researchgate.net/publication/319606934_Caracterizacion_de_propoleos_provenientes_del_municipio_de_Caldas_obtenido_por_dos_metodos_de_recoleccion)

- Arévalo C. Efecto antimicrobiano in vitro de tres variedades de própolis frente a Streptococcus Mutans ATCC 25175. [Trabajo para optar el título profesional de cirujano dentista]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2014. [Citado 16 de Octubre 2020]

Disponible en:

[http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/1111/1/AR%C3%89VALO\\_CI\\_NDY\\_ANTIMICROBIANO\\_IN\\_VITRO.pdf](http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/1111/1/AR%C3%89VALO_CI_NDY_ANTIMICROBIANO_IN_VITRO.pdf)

- Vázquez J. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola I – Cuenca del Salado, Pcia. De Buenos Aires. [Trabajo para optar el grado de Doctor]. Buenos Aires: Universidad Politécnica de Valencia. 2010. [Citado 20 de Octubre 2020]

Disponible en:

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12264/tesisUPV3345.pdf?sequence=1>

- Souza E, Zaluski R, Veiga N, Orsi R. Effects of seasonal variations and collection

methods on the mineral composition of propolis from *Apis mellifera* Linnaeus Beehives. *Brazilian Journal of Biology*. 2016; 76(2): 396-401. [Citado 01 de Enero 2021]

Disponible en: <https://www.scielo.br/pdf/bjb/v76n2/1519-6984-bjb-1519-698416714.pdf>

9. Checalla J. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo sobre el *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175) in vitro, Tacna 2020. [Trabajo para optar el título profesional de cirujano dentista] Tacna, Perú: Universidad Privada de Tacna. 2020 [Citado 20 de Octubre 2020]

Disponible en: <http://repositorio.upt.edu.pe/handle/UPT/1418>

10. Huaytalla R, et al. Efecto inhibidor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. *Rev Estomatol Herediana*. 2018; 28(1):36-43. [Citado 24 de Noviembre 2020]

Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1019-43552018000100005](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1019-43552018000100005)

11. Cayo C, Quijandría L, Ramos J. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del Propóleo sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). *Ciencia y Desarrollo*. 2016; 19 (2): 19-24. [Citado 20 de Octubre 2020]

Disponible en: <https://core.ac.uk/reader/228575190>

12. Barrientos L, et al. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013; 44 (2):577-585. [Citado 20 de Octubre 2020]

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833163/>

13. Ophori E, Eriagbonye B, Ugbofada P. Antimicrobial activity of propolis against *Streptococcus mutans*. Afr. J. Biotechnol. 2010; 9 (31): 4966-4969. [Citado 20 de Octubre 2020]  
Disponible en: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92115>
14. Alegría A. Prevalencia de caries dental en niños de 6 a 12 años de edad atendidos en la clínica pediátrica de la Universidad Alas Peruanas utilizando los criterios de ICDAS II. [Trabajo para optar el título profesional de cirujano dentista]. Lima: Universidad Alas Peruanas. 2010. [Citado 20 de Octubre 2020]  
Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/14136609/prevalencia-de-caries-dental-en-ninos-de-6-a-12-anos-de-edad->
15. Rueda M. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra *Streptococcus mutans*. [Trabajo para optar el título profesional de cirujano dentista]. Quito: Universidad Central de Ecuador. 2015. [Citado 20 de Octubre 2020]  
Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4573>
16. Benítez J. Prevalencia de caries dental en niños escolares de 4 a 14 años de edad de la escuela fiscal mixta “La gran muralla” ciudad de Ambato En el mes de mayo del 2011. [Trabajo para optar el título profesional de cirujano dentista] Quito: Universidad Central de Ecuador. 2011. [Citado 20 de Octubre 2020]  
Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/846/3/T-UCE-0015-24.pdf>
17. Salas S. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Physalis Peruviana* vs clorehexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans*. [Proyecto de investigación

presentado como requisito previo a la obtención del título de Odontóloga] Quito: Universidad Central de Ecuador. 2017. [Citado 27 de Octubre 2020]

Disponible en: [http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880481/efecto-antibacteriano-del-aceite-esencial-de-physalis-peruviana\\_RpYlqp2.pdf](http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880481/efecto-antibacteriano-del-aceite-esencial-de-physalis-peruviana_RpYlqp2.pdf)

18. Fontes C. Presencia de Streptococcus mutans y Lactibacillos spp en pacientes con xerostomía, antes y después del tratamiento con neuro-electro-estimulación. [Trabajo para obtener el grado de maestría en Ciencias odontológicas con especialidad en Periodoncia]. México: Universidad autónoma de Nuevo León. 2012. [Citado 27 de Octubre 2020]

Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2791/>

19. Ramos M. Uso del propóleo en el proceso de cicatrización post extracción dentaria en pacientes diabéticos [Trabajo para optar el título profesional de cirujano dentista]. Guayaquil: Universidad de Guayaquil. 2014. [Citado 27 de Octubre 2020]

Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/5266/1/RAMOSmartha.pdf>

20. Frankland A, Da Silva I, Marcucci M. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. Chemistry Central Journal. 2011; 5(27). [Citado 01 de Enero 2021]

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123264/pdf/1752-153X-5-27.pdf>

21. Galarza L. Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico del propóleo sobre Staphylococcus Aureus y Escherichia Coli presentes en metritis

puerperal bovina. [Trabajo para obtención del título de magister en reproducción animal]. Cuenca: Universidad de Cuenca. 2013. [Citado 27 de Octubre 2020]

Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/538>

22. Castillo D, Chipatecua F. Efecto de la localización geográfica y el método de recolección en la producción de propóleo crudo de colmenas de Apis Mellifera sobre indicadores de calidad fisicoquímicos y microbiológicos, en la provincia del Sumapaz, Cundinamarca. Colombia: Universidad de Cundinamarca. 2016 [Citado 27 de Octubre 2020]

Disponible en:

<http://repositorio.ucundinamarca.edu.co/bitstream/handle/20.500.12558/194/Articulo-Cient%C3%ADfico-%20Diego%20Castillo%20Corredor%2C%20%20Fabian%20Chipatecua.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

23. Jalal A, et al. Applications of Propolis in Dentistry: A Review. Ethiop J Health Sci. 2018; 28(4). [Citado 01 de Enero 2021]

Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6308739/pdf/EJHS2804-0505.pdf>

24. Pobiega K, et al. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. J Food Sci Technol. 2019; 56(12):5386–5395. [Citado 01 de Enero 2021]

Disponible en:

[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6838241/pdf/13197\\_2019\\_Article\\_4009.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6838241/pdf/13197_2019_Article_4009.pdf)

25. Sanca M. Tipos de investigación científica. Rev. Act. Clin. Med. La Paz. 2011; 12.  
[Citado 01 de Noviembre 2020]  
Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v12/v12\\_a11.pdf](http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/raci/v12/v12_a11.pdf)
26. Veiga J, De la Fuente E, Zimmermann M. Modelos de estudios de investigación aplicada: conceptos y criterios para el diseño. Med Segur Trab. España. 2008; 210, 81-88. [Citado 01 de Noviembre 2020]  
Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0465-546X2008000100011](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0465-546X2008000100011)
27. Rico E. Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante de propóleos de distintos orígenes. [Trabajo fin de grado en Ciencia y Tecnología de Alimentos] Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 2015. [Citado 28 de Noviembre 2020]  
Disponible en:  
[https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54188/TFG\\_Elias3.1\\_14362651275206213081138792609195.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54188/TFG_Elias3.1_14362651275206213081138792609195.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
28. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Código de ética para la investigación. Perú. 2020. Versión 002. [Citado 12 de Diciembre 2020]  
Disponible en:  
<https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2019/codigo-de-etica-para-la-investigacion-v002.pdf>

## Anexos

### Anexo 01: Instrumento de recolección de datos

#### TABLA DE RESULTADOS

N° de placa	Métodos de recolección									CONTROL	
	A			B			C			+	-
	5%	10%	30%	5%	10%	30%	5%	10%	30%	Gluconato de Clorhexidina 0.12%	Agua destilada
1											
2											
3											
4											
5											

N° de placa	Métodos de recolección									CONTROL	
	A			B			C			+	-
	5%	10%	30%	5%	10%	30%	5%	10%	30%	Gluconato de Clorhexidina 0.12%	Agua destilada
1	-	-	1.1 cm	-	-	1.4 cm	-	-	-	3.5 cm	-
2	-	-	1.2 cm	-	-	1.1 cm	-	-	-	3.5 cm	-
3	-	-	1.1 cm	-	-	1.3 cm	-	-	-	3.5 cm	-
4	-	-	1.1 cm	-	-	1.3 cm	-	-	-	3.5 cm	-
5	-	-	1.1 cm	-	-	1.3 cm	-	-	-	3.5 cm	-

## Anexo 02:

### Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Método de Raspado Metálico 5%	.	5	.	.	5	.
Método de Raspado Metálico 10%	.	5	.	.	5	.
Método de Raspado Metálico 30%	,473	5	,001	,552	5	,000
Método de Raspado Plástico 5%	.	5	.	.	5	.
Método de Raspado Plástico 10%	.	5	.	.	5	.
Método de Raspado Plástico 30%	,372	5	,022	,828	5	,135
Método de Malla Plástica 5%	.	5	.	.	5	.
Método de Malla Plástica 10%	.	5	.	.	5	.
Método de Malla Plástica 30%	.	5	.	.	5	.
Gluconato de Clorhexidina 0.12%	.	5	.	.	5	.
Agua destilada	.	5	.	.	5	.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Realizado con IBM SPSS Statistics

### Anexo 03:

#### Fotografías de los distintos procedimientos realizados



Figura N° 01: Las cuatro colmenas utilizadas en el estudio, ubicadas en el caserío El Porvenir, provincia de Otuzco, departamento de La Libertad.



Figura N° 02: En dos colmenas se colocaron mallas plásticas para la recolección de propóleo, durante los meses de Octubre 2016 – Enero 2017.



Figura N° 03: En las otras dos colmenas se utilizaron métodos de raspado, en una con espátula metálica y en otra con espátula plástica.



Figura N° 04: Se pesaron 50 g de cada método de recolección.





Figura N° 05: Se realizaron extractos etanólicos de propóleo a concentraciones de 5%, 10% y 30%.

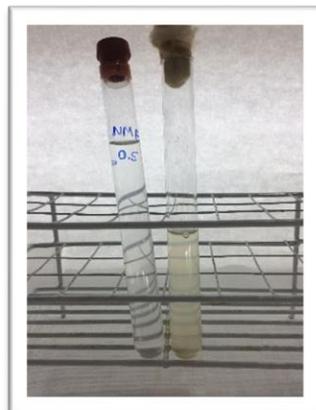


Figura N°06: Se reactivó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, y se inocularon en 20 placas de Muller Hinton.

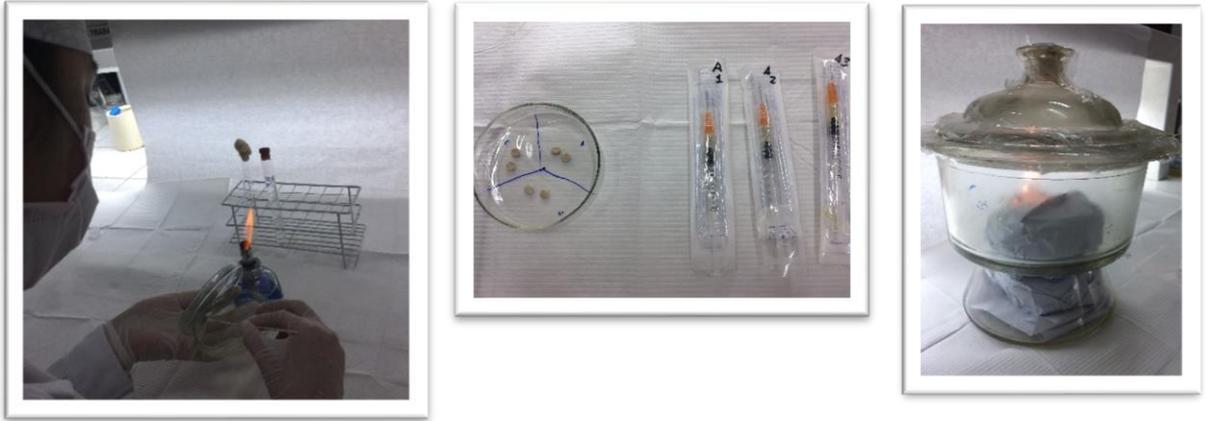


Figura N° 07: Se utilizó la técnica de Kirby-Bauer para determinar el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de propóleo.

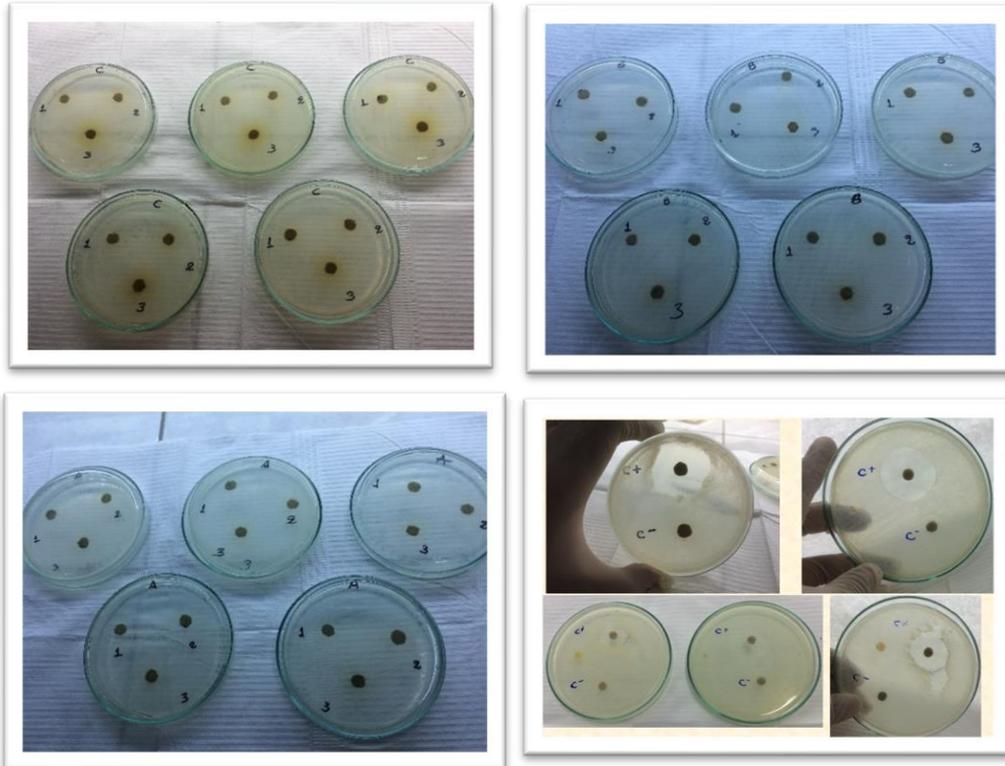


Figura N° 08: Las placas se incubaron durante 48 horas, posteriormente se midieron los halos de inhibición.

## Anexo 03: Constancia de asesoría microbiológica



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

### CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo **MANUELA LUJÁN VELASQUEZ**, docente de la cátedra de inmunología del Departamento Académico de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 4546.

Dejo constancia de estar asesorando a la alumna **MARÍA ALEJANDRA OBANDO PAZ**, en la parte microbiológica, en el laboratorio de Inmunología de la Universidad Nacional de Trujillo con la tesis "*Comparación del efecto antibacteriano del propóleo obtenido mediante tres tipos de recolección sobre cepas de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)*".

Atentamente,

MANUELA LUJÁN VELASQUEZ  
Docente de Inmunología  
Departamento de Microbiología

Dr. **Manuela Raymundo Luján Velasquez**  
CATEDRA DE INMUNOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

El presente trabajo de investigación recibió asesoría microbiológica a cargo de la docente Manuela Luján Velasquez.

## Anexo 04: Constancia de asesoría farmacéutica



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Trujillo, 16 de enero del 2017

### CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo, **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**, docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727 y acreditada como Docente Investigadora por CONCYTEC con número de registro REGINA: N°1582.

Dejo constancia de haber asesorado a la alumna **MARÍA ALEJANDRA OBANDO PAZ**, en las actividades de preparación de los extractos y sus concentraciones, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de La Universidad Nacional de Trujillo. Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas, serán utilizadas para el desarrollo de la tesis titulada:

“Comparación del efecto antibacteriano del propóleo obtenido mediante tres tipos de recolección sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)”.

Atentamente,



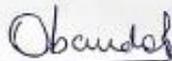
  
Dra. **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**  
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Laboratorio de Farmacognosia  
Universidad Nacional de Trujillo

Asimismo, se recibió asesoría farmacéutica en la preparación de los extractos a cargo de la docente investigadora Marilú Roxana Soto Vásquez.

## Anexo 05: Declaración jurada de conflicto de intereses

### DECLARACIÓN JURADA

Yo, María Alejandra Obando Paz identificada con DNI N° 70758151, autora de la investigación “Efecto antibacteriano, *in vitro*, de tres métodos de recolección de extractos etanólicos de propóleo sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, declaro que el material presentado es producto original e inédito y que no existe ningún conflicto de intereses con ninguna institución o persona sobre la investigación presentada.



---

María Alejandra Obando Paz

DNI 70758151