



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

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

**“COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO  
COMERCIAL VS PROPÓLEO DE LA SERRANÍA  
SOBRE CULTIVOS DE ENTEROCOCCUS  
FAECALIS”**

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

**AUTOR**

**INFANTES VERA, ROSARIO DEL PILAR**

**ASESOR**

**Mgtr. MILLONEZ GÓMEZ, PABLO ALEJANDRO**

**TRUJILLO – PERÚ**

**2017**

## 1.- TÍTULO

# **“COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO COMERCIAL VS PROPÓLEO DE LA SERRANÍA SOBRE CULTIVOS DE ENTEROCOCCUS FAECALIS”**

**JURADO EVALUADOR DE LA TESIS**

**Mgtr. Elias Ernesto, Aguirre Siancas**

**Presidente**

**Mgtr. Edwar Richard, Morón Cabrera**

**Miembro**

**Mgtr. Tammy Magarita, Honores Solano**

**Miembro**

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme llegar hasta una de mis metas básicas para continuar con mis proyectos futuros, por sus infinitas bendiciones en todo el transcurso de mí carrera profesional.

A mi **Madre**, Flor Isabel Vera Ruiz, sus consejos, ayuda emocional y apoyo económico que es uno de los más grandes tesoros de este mundo.

A mi **Docente Asesor**, Pablo A. Millones Gómez, su ayuda metodológica para el desarrollo de mi tesis fue una guía esencial de aporte científico.

## DEDICATORIA

A todos aquellos estudiantes, científicos, e investigadores que hagan uso de este trabajo para fomentar mayores investigaciones acerca del tema planteado en este trabajo de tesis.

A mi madre, padre y hermanas por su amor incondicional, su apoyo.

A mi hijita y esposo a los cuales tanto amo, su amor, paciencia, me permiten tener la fortaleza de mejorar cada día.

## RESUMEN

El propósito del estudio fue comparar la efectividad antimicrobiana del extracto de propóleo comercial (EPC) vs extracto propóleo de la serranía (EPS) sobre cultivos de *E. faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas, determinar la concentración mínima inhibitoria y las características organoléptica y fisicoquímica. El nivel de la investigación fue de tipo cuantitativo-in vitro. Utilizándose dos muestras: serrano y comercial, del propóleo serrano se prepararon 3 extractos, a los cuales se les denominó extracto etanólico de propóleo N°1 (EEP N°1) (10%, 20% y 30%), extracto hidroalcohólico de propóleo N°2 (EHP N°2) (10%, 20% y 30%), y extracto etanólico de propóleo N°3 (EEP N°3) (0.4%), Evaluándose el efecto antimicrobiano: Difusión en disco e interposición de caldo. Resultados: El EPC logro efectividad antimicrobiana frente a *E. faecalis*, donde los halos inhibitorios se mantuvieron desde las 24 horas hasta las 72 horas de evaluación. EEP N°1 y N°3 demostraron efectividad antimicrobiana generando halos inhibitorios crecientes a medida que la concentración era mayor. El EHP N°2 al 10%, 20% y 30% demostró efecto antimicrobiano a través de la formación de halos inhibitorios diferentes entre cada concentración, no hallándose diferencia entre los tiempos de observación. La CMI del EEP N°1 para inhibir el crecimiento de *E. faecalis*, fue 500mg/ml. Concluyendo: EEP N°1, EHP N°2 y EPP N°3 logran mayores halos inhibitorios en comparación con EPC y no hay diferencia entre las mediciones de tiempo.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, Propóleo, *Enterococcus faecalis*.

## ABSTRACT

The purpose of the study was to compare the antimicrobial effectiveness of commercial propolis extract (EPC) versus propolis extract of the serrania (EPS) on cultures of *E. faecalis*, according to the measurement times 24, 48 and 72 hours, determine the minimum inhibitory concentration and organoleptic and physicochemical characteristics. The level of research was quantitative-in vitro. Using two samples: serrano and commercial, from Serrano propolis, 3 extracts were prepared, which are called ethanolic extract of propolis N°1 (EEP N°1) (10%, 20% and 30%), hydroalcoholic extract of propolis N°2 (EHP N°2) (10%, 20% and 30%) and ethanolic extract of propolis N°3 (EEP N°3) (0.4%), evaluating the antimicrobial effect: Disc diffusion and broth interposition. Results: The EPC achieved antimicrobial effectiveness against *E. faecalis*, where inhibitory halos were maintained from 24 hours to 72 hours of evaluation. EEP N°1 and N°3 demonstrated antimicrobial effectiveness generating increasing inhibitory halos as the concentration was higher. EHP N°2 to 10%, 20% and 30% demonstrated antimicrobial effect through the formation of different inhibitory halos between each concentration, not finding any difference between observation times. The CMI of EEP N°1 to inhibit the growth of *E. faecalis*, was 500mg / ml. concluding: EEP N°1, EHP N°2 and EPP N°3 achieve greater inhibitory halos in comparison with EPC and there is no difference between the measurements of time.

Key words: Antibacterial effect, Propolis, *Enterococcus faecalis*.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1.-TÍTULO .....	i
2.-PAGINA DE JURADO .....	ii
3.-AGRADECIMIENTOS .....	iii
4.-DEDICATORIA .....	iv
5.-RESUMEN .....	v
6.-ABSTRACT .....	vi
7.-CONTENIDO .....	vii
8.-ÍNDICE DE TABLA .....	viii
9.-ÍNDICE DE GRAFICO .....	ix
I INTRODUCCIÓN.....	1
II REVISION DE LITERATURA.....	3
III. HIPÓTESIS.....	16
IV. METODOLOGÍA .....	16
4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	16
4.2 NIVEL DE INVESTIGACIÓN.....	16
4.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA .....	17
4.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....	18
4.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	20
4.5 PLAN DE ANÁLISIS.....	23
4.6 MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	24
<b>V. RESULTADOS</b>	
5.1 RESULTADOS .....	25
5.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	31
VI. CONCLUSIONES .....	35
VII. RECOMENDACIONES.....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto etanólico de propóleo comercial sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i> , según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.....	25
TABLA 2 Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico serrano N° 1 al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i> , según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.....	26
TABLA 3 Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico serrano N° 2 al 10 %, 20%, 30% de propóleo sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i> , según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.....	27
TABLA 4 Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico serrano N° 3 de propóleo sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i> , según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.....	28
TABLA 5 Concentración mínima inhibitoria del extracto de propóleo natural N° 1.....	29
TABLA 6 Determinación de las características organolépticas y físico químicas.....	30

## ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico 01: Concentración mínima inhibitoria del Propóleo etanólico Serrano nº 1 .....	72
---	----

## 1.-INTRODUCCIÓN

La cavidad oral alberga múltiples microorganismos donde todos se encuentran en interacción, logrando un ambiente homeostático. El equilibrio del ecosistema de la cavidad oral se ve alterado cuando hay factores que modifican este medio, provocando que la microbiota se altere, donde algunas especies predominan sobre otras trayendo consigo enfermedades.<sup>1</sup>

Las infecciones post-endodónticas, se desarrollan producto del ingreso del microorganismo *Enterococcus faecalis* en el sistema de conductos a través de una filtración directa o por la supervivencia del microorganismo en el conducto luego de haber realizado el tratamiento endodónticos.<sup>2</sup>

Las infecciones post-endodónticas son afectaciones muy comunes, los cuales representan un problema odontológico a nivel mundial, donde diversas investigaciones se vienen desarrollando con el fin de encontrar como prevenir y dar tratamiento.

Los productos naturales se presentan como una alternativa ante este problema, ya que los fármacos que se encuentran en el mercado no cumplen con el rol de erradicar estas infecciones, y si cumplen este propósito generan muchos daños a nivel sistémico del paciente o los microorganismos patógenos ya han creado resistencia frente a ellos.<sup>3</sup>

El propóleo se presenta como un producto prometedor para limitar las infecciones, es una sustancia resinosa que es elaborada por las abejas su proceso inicia en la recolección de las yemas y exudados de diferentes plantas, las abejas lo utilizan para proteger sus colmenas de diferentes insectos enemigos, cubrir sus apiarios para mantener la temperatura, mantener aséptica su colmena entre otras funciones más que se le atribuyen.<sup>4</sup>

Si consideramos que el uso indiscriminado de antibióticos, ha generado resistencia bacteriana, el empleo de nuevas alternativas preventivas y terapéuticas, como el propóleo, se convierten en necesarias y en evidencia aún no se han descrito resistencia alguna.<sup>4</sup> Además, las investigaciones avalan propiedades biológicas: antimicrobiana, antimicótica, antioxidante, antiinflamatoria, regeneradora de tejidos, entre otras; que aportarían un plus si este llegaría a utilizarse en prevenir y tratar enfermedades de la cavidad oral.<sup>5 -11,13-16</sup>

La investigación en el Perú usando a este producto no es significativa, por ello pretendemos averiguar a través de la realización de este estudio si el propóleo que se comercializa en un estándar considerable vs el propóleo de la serranía posee actividad antimicrobiana similar o alguno de estos supera al otro. El objetivo del presente trabajo es comparar la efectividad antimicrobiana del extracto de propóleo comercial vs propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas y además determinar las características organoléptica y fisicoquímica de propóleo serrano y comercial.

## II.- REVISIÓN DE LA LITERATURA.

### 2.1.- Antecedentes:

Lugo E, et al<sup>17</sup> (2012) presentaron un estudio con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico del propóleo (EMP), y sus fracciones hexánica, clorofórmica y metanólica residual, frente a aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Encontrando en sus resultados: El EMP mostró una concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 200.0 y 400.0mg/L frente a *S. aureus* y de 400.0mg/L para *E. faecalis*. La fracción clorofórmica (FC) presentó la más alta actividad frente a *S. aureus* (MCI 200.0mg/L) y moderada frente a *E. faecalis* (MCI 400 mg/L). El EMP y su FC de la región El Arenoso y Sonora presentan actividad antibacteriana contra aislados clínicos de *S. aureus* y *E. faecalis*. Concluyendo que, debido a su actividad antibacteriana, el EMP de la región de El Arenoso y Sonora, podría ser utilizado en diversos procesos con el fin de controlar el desarrollo bacteriano.

Aguirre N<sup>18</sup> (2015) presenta un estudio con el objetivo de determinar la efectividad antimicrobiana in vitro del paramonoclorofenol y propóleo sobre *Enterococcus faecalis*. Realizo un estudio in vitro en donde se comparó la medición de los halos de inhibición del paramonoclorofenol y el extracto de propóleo de origen comercial(no indican solvente) al 5%, 70%, 90% sobre una cepa pura de *Enterococcus faecalis* medio líquido. Obteniendo en sus resultados: las dos sustancias evaluadas tuvieron acción antimicrobiana con una diferencia no significativa entre los promedios de halos ante el *Enterococcus faecalis*; para propóleo al 5% resulto con una media de 9.16 mm, propóleo 70% con un media de 12.58 mm y propóleo al 90% con una media de 12.91 mm; Concluyendo que el paramonoclorofenol y los extractos del propóleo al 70% y 90% son efectivos antimicrobianos, además de ser un producto natural y ser de menor costo.

Alvares M<sup>19</sup> (2014) presenta un estudio con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Propolis de apis mellífera “propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. El estudio lo desarrollaron en Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo(UNT). La muestra estuvo constituida por 80 placas petri, teniendo 5 grupos de 16 placas, más un grupo control, conteniendo el medio Müller Hinton respectivamente con el extracto hidroalcohólico (70°) de Propolis de Apis Mellífera “Propóleo” y *Enterococcus faecalis*. El propóleo fue obtenido de un centro apicultor de Huaraz-Ancash y preparado en el laboratorio de farmacia y bioquímica de la UNT. El efecto antibacteriano se determinó a través de la concentración mínima bacteriana (CMB), y la susceptibilidad bacteriana. El análisis estadístico se inició mediante la prueba de SHAPIRO-WILK para contrastar la normalidad, y KRUSKALL-WALLIS, se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan. La significancia estadística considerada fue de 5%. Obteniendo en sus resultados, el extracto de propóleo al 25% obtuvo una media de halos inhibitorios de 8.56 mm, al 50% una media de 11.81 mm, al 75% una media de 11.63 mm y al 100% una media de 12.63 mm. Concluyendo que el extracto etanólico de Propolis de Apis Mellífera “Propóleo” posee efecto antibacteriano in vitro frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, siendo la diferencia estadísticamente significativa entre la concentración al 25% con 75% (p=0.024) y 25% con 100% (p=0.025), más no con la concentración al 50%. En la susceptibilidad bacteriana se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones al 25% con las otras tres concentraciones evaluadas, más no se observaron diferencias entre estas últimas concentraciones.

Gonzalón L<sup>20</sup> (2015) presenta un estudio con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano del extracto del Propóleo en comparación con el hidróxido de calcio como medicamento intraconducto en cultivo in vitro del *E. faecalis*. La muestra de propóleo fue obtenida de la sierra(Imbara-Ecuador) de un centro apicultor. Para ello se prepararon extractos de propóleo

hidroalcohólico (70°) y se prepararon porcentajes: 10% y 20%, luego se procedió a colocar discos de papel filtro impregnados de las sustancias en medios de cultivo Mueller Hinton en los que previamente se inoculó al *E. faecalis* ATCC 29212; posteriormente los medios de cultivos fueron incubados por 24 horas a 37°C. Las lecturas de los halos de inhibición se recolectaron en tablas pre elaboradas y analizados por programas estadísticos con las pruebas de ANOVA y TUKEY, obteniendo en sus resultados: el extracto de propóleo al 10% obtuvo un promedio de 14.8 mm siendo el más efectivo contra el *E. faecalis*, extracto de propóleo al 20% una media de 12.4 mm y el hidróxido de calcio con 8,7 mm. Concluyendo que el extracto etanólico de propóleo fue mejor que el hidróxido de calcio como antimicrobiano contra *E. faecalis*.

Carrillo, et al<sup>21</sup> (2011) presentaron un estudio con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana del propóleo de Huasteca Potosina y analizar el efecto que tienen la procedencia y el tipo de extracto sobre el crecimiento de bacterias Gram negativas y Gram positivas. Se prepararon extractos donde se colocó 20g / 200 ml de propóleo en etanol y agua por el método de Soxhlet y reflujo. Se realizó la dilución en caldo para probar la actividad antimicrobiana, el propóleo lograría efecto inhibiendo crecimiento bacteriano en el medio de cultivo. Encontrando como resultados: el extracto etanólico fue más inhibitorio que el acuoso, la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico fue 0.93mg/ml<sup>-1</sup> para las bacterias Gram positivas, en el extracto acuoso CMB fue de 20mg/ml<sup>-1</sup> y 30 mg/ml<sup>-1</sup> para Gram negativas. Concluyendo: Los extractos acuosos y etanólicos del propóleo tienen actividad antibacteriana, esta depende de la procedencia de los propóleos, del tipo de solvente empleado en su extracción y de la especie bacteriana sobre la cual se enfrenta el propóleo. Los extractos etanólicos tienen una mayor actividad antibacteriana en comparación con los extractos acuosos, siendo las bacterias Gram positivas más susceptibles que las bacterias Gram negativas, a los extractos etanólicos del propóleo.

Palomino, et al<sup>22</sup> (2010) realizó un estudio con el objetivo de evaluar las características fisicoquímicas, y la actividad antifúngica y antibacteriana del propóleo colectado en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). Metodología: para evaluar el efecto antifúngico se prepararon posos en placas Petri y se evaluaron l concentraciones 50, 100, 250, 500, 1000 mg de resina en mL-1 de etanol y se determinó el diámetro de crecimiento micelial; el efecto antimicrobiano fue evaluado por el método de difusión de agar y las concentraciones de estudio fueron: 0,1; 1,0 y 10 mg de resina en mL-1 de etanol y se determinó el halo de inhibición de crecimiento. Obteniendo como resultado que el propóleo presenta un alto contenido de resinas solubles en etanol, este inhibió el crecimiento de los hongos y bacterias, observándose sobre todo el retraso de crecimiento en concentraciones de 500 y 1000 mg\*ml-1 para hongos evaluados, y para bacterias *B. subtilis* mostró halos inhibición 8 mm para las concentraciones de 1,0 y 10,0 mg\*mL-1 , *E. coli* y *S. Tiphy* mostraron halos de inhibición entre 5-6 mm para las concentraciones ensayadas, *S. aureus* mostró halos de inhibición de 2 mm para las concentraciones ensayadas, el análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas detectaron componentes: ácidos grasos, esteroides, triterpenos y diterpenos. Concluyendo: composición fisicoquímica es compleja y depende de la vegetación circundante del sitio de recolección; para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó resina de propóleo disuelto en etanol , obteniendo como resultado que en bacterias Gram negativas no presentan halos de reducción de crecimiento significantes, mientras que las bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*), si presentaron halos de inhibición significativa y a mayor concentración el halo de inhibición fue mayor convirtiéndose en bactericida.

Marmanillo G.<sup>23</sup> (2012) presentó un estudio con el objetivo de comparar de manera invitro la acción antimicrobiana del propóleo (hidroalcohólico 70°- Chiclayo), hidróxido de calcio y la combinación de estos frente al *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™\*. Metodología: de manera in vitro en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis mediante la técnica de

difusión en placa, se ensayó el extracto de propóleo al 5% (2.5mg/50ul), hidróxido de calcio (50mg/50ul), y la combinación del extracto de propóleo al 5% con hidróxido de calcio (2.5mg/50ul + 50mg/50ul) y se estableció como grupo control negativo al etanol químicamente puro. Para determinar la acción antimicrobiana se midieron los halos de inhibición después de incubación de 72 horas, para propóleo al 5% halos inhibitorios de 14.3 mm en aerobiosis y 12.2 mm en anaerobiosis, Hidróxido de calcio 23.9 mm en aerobiosis y 15.0 mm en anaerobiosis, combinación de propóleo + hidróxido de calcio 26.7 mm en aerobiosis y 16.9 mm en anaerobiosis, control (etanol 96°) 0 mm para aerobiosis y anaerobiosis. Concluyendo: la combinación del extracto de propóleo al 5% con hidróxido de calcio presenta una mayor acción antimicrobiana in vitro y halo inhibición es mayor en condiciones aerobiosis y anaerobiosis frente al *S. mutans*.

Dos Santos, et al<sup>24</sup> (2003) realizaron un estudio con el objetivo de optimizar el proceso de extracción con el fin de determinar la obtención de tintes de propóleo con mayor actividad antimicrobiana usando distintos porcentajes de alcohol. Metodología: Se prepararon extractos etanólicos y se evaluó el efecto antimicrobiano con discos de difusión en agar. Obteniendo en sus resultados, que el propóleo diluido en alcohol 96%, 90%, 80%, 70%,60%,50% mostrando de halos inhibitorios de 9-10 mm y 40% de halos inhibitorios de 9 mm, 30% de halos inhibitorios de 8 mm y 20% y 10% mostro halos inhibitorios de 0 mm. Alcohol, agua mostro halos inhibitorios de 0 mm y vancomicina mostro halos inhibitorios de 18 mm. Concluyendo: la mayor actividad antimicrobiana se obtienen con extractos que contienen etanol al 50 - 96%, sugiriendo que el alcohol de 70 % es el ideal para la obtención de tinturas de propóleo, Cabe resaltar que su muestra de microorganismo fue el *Staphylococcus aureus*, el cual ha mostrado ser una cepa multirresistente.

Manrique A.<sup>25</sup> (2006) realizó un estudio con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de los propóleos colectados y la influencia estacional, en dos zonas

geográficas. Metodología: se recolectaron muestras de propóleo provenientes de dos apiarios ubicados en dos zonas totalmente distintas, la primera ubicada en un bosque húmedo y la segunda en un bosque seco tropical durante octubre de 2001 hasta setiembre del 2002. Se colectaron muestras de propóleos provenientes de dos apiarios del estado Miranda, Venezuela, ubicados en diferentes zonas de vida. La primera localidad se ubica en un bosque húmedo premontano en el Municipio Guaicaipuro y la segunda en un bosque seco tropical en Guatire, Municipio Zamora, desde octubre de 2001 hasta septiembre de 2002. Para el análisis de los datos, se empleó un modelo mixto basado en mediciones repetidas en el tiempo, en cada localidad estudiada y se aplicó la prueba de media de Tukey. Obteniendo resultados: Todos los extractos etanólicos de propóleos (EEP) estudiados mostraron actividad antimicrobiana, al inhibir el crecimiento del *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 con halos de inhibición de hasta 30 mm y del *Micrococcus luteus* ATCC 9.341. Las muestras de EEP recolectadas en bosque seco en enero y julio la mostraron mayor actividad antimicrobiana. Concluyendo que los propóleos estudiados muestran influencia estacional en la inhibición del crecimiento bacteriano y que los EEP pueden ser usados como agentes antimicrobianos contra *S. aureus* y *M. luteus*.

Salaverry, et al<sup>26</sup> (2011) realizaron una investigación con el objetivo de evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de dos extractos etanólicos de propóleos frente a dos cepas de *Enterococcus faecalis* y cuatro cepas de bacterias anaerobias: *Fusobacterium nucleatum* y tres *Prevotella intermedia* y *Prevotella negrescens*, en comparación con etanol. En su metodología describen el uso de soluciones alcohólicas de propóleos de diferente composición, nombrándolas como solución A (99 g/ ml) y solución B (182 g/ml). Se realizó la CMI partiendo de una concentración de 512 g / ml usando el método de dilución en agar. El inóculo que se uso fue de 1, 5108 UFC/ ml. Obtuvieron en sus resultados que la CMI para las dos cepas de *Enterococcus faecalis* fue de 256 g/ml con diluyente de alcohol

etélico al 99%; para cuatro las bacterias anaerobias la CMI fue de 1024 g/ml utilizando como diluyente alcohol al 20 %.

Tolosa-Cañizares<sup>27</sup> (2002) presentan un estudio el cual tiene como objetivo caracterizar en forma general los extractos acuosos y alcohólicos de las muestras de propóleos de Campeche, compararon los rendimientos de sustancias solubles obtenidos con los dos solventes y comparar la actividad antimicrobiana de los distintos extractos sobre bacterias Gram positivas (*S. pyogenes* y *S. aureus*) y Gram negativos (*S. typhi*, y *P. aeruginosa*), tomando en cuenta la procedencia del propóleo, el tipo de solvente empleado (etanol y agua) y la especie bacteriana evaluada. En su metodología establecieron la obtención de muestras de propóleo denominándolas del 1-10 según la procedencia y tipo de vegetación. La preparación de los extractos fue por el método de reflujo en un equipo soxhlet añadiéndole 20 g de propóleo y 200 ml de etanol al 80 % o agua según el extracto que se pretendía obtener; la recuperación de extracto soluble total se realizó con alcohol de 60 % o agua destilada y preparando soluciones cuya concentración se ajustó a 30 mg/ml. Obteniendo como resultados, las muestras de propóleo presentaron colores variados (claro - café oscuro); el rendimiento en sólidos solubles totales superior en los etanólicos que en los acuosos. Se lograron identificar metabolitos: lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides, flavonoides, sustancias aminadas y leucoantocianidinas, estas últimas sólo en los extractos acuosos. La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos los más efectivos y en menor concentración (3.33 mg/ml) en comparación con el extracto acuoso (11.16 mg/ml). Concluyendo que la efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos los más efectivos, en particular los obtenidos de propóleos procedentes de Hampolol. La especie bacteriana más sensible resultó ser la *P. aeruginosa* y la *S. typhi* la más resistente.

Suleman y et al<sup>28</sup> (2015) presentaron un estudio con el objetivo de probar la eficacia de propóleos e hidróxido de calcio, así como en combinación con los medicamentos de endodoncia establecidos (moxifloxacino y ciprofloxacino). Las diversas combinaciones eran Grupo 1: propóleos, Grupo 2: hidróxido de calcio, Grupo3: moxifloxacino, Grupo 4: ciprofloxacino, Grupo 5: propolis + moxifloxacino, Grupo 6: propolis + ciprofloxacino, Grupo 7: hidróxido de calcio + ciprofloxacino, Grupo 8: hidróxido de calcio + moxifloxacina. La eficacia de estos medicamentos se puso a prueba mediante la comprobación de la zona de inhibición para la cepa específica (ATCC 29212) de *E. faecalis* en diferentes intervalos de tiempo, es decir, 24, 48 y 72 horas. Concluyendo que el propóleos e hidróxido de calcio mostro efecto sinérgico con moxifloxacino y ciprofloxacino contra *E. faecalis*, por ello se determinó el propóleo en combinación con antibióticos y sola es más eficaz que el hidróxido de calcio.

Jara R <sup>29</sup> (2014) presentó un estudio con el objetivo de evaluar in vitro el efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) teniendo un diseño de estudio experimental in vitro. Para ello se comparó el efecto antibacteriano de cuatro marcas comerciales de propóleo Tintura de propóleo Farmagel, Tintura de propóleo Max, Madre Natura, Kaita® y un extracto metanólico de propóleo de Oxapampa (elaborado en laboratorio), se estableció un control positivo de clorexidina (0.12%). Utilizaron la técnica del pocillo (10 por cada extracto propóleo y por *S. mutans* y *S. sanguinis* individualmente), la medición del halo inhibitorio fue con una regla Vernier después de una incubación de 72 horas. Obteniendo en sus resultados que el extracto metanólico de propóleo de Oxapampa presentó halos de inhibición de mayor tamaño con una media de 33.15 mm frente a las cepas de *S. mutans* y para el *S. sanguinis* su media fue de 23.23 mm. En el caso de los 4 extractos de propóleo comerciales, sólo 3 de ellos (Tintura de propóleo Farmagel, Madre Natura y Kaita®), tuvieron actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas, en todos los casos

la actividad antibacteriana es menor que el control clorexidina 0.12%. Concluyendo que el extracto metanólico de Oxapampa elaborado en el laboratorio tiene mayor actividad antibacteriana que los extractos comerciales frente a las cepas estudiadas y de los 4 propóleos comerciales evaluados en el estudio, sólo tres de ellos tiene actividad antibacteriana frente a las cepas de estudio.

## 2.2.- Bases teóricas de la investigación:

### 2.2.1 ANTIMICROBIANO CONTEMPLADO PARA EL ESTUDIO:

El uso de plantas y productos naturales se ha convertido en un punto importante de investigación en la medicina tradicional, el conocimiento científico de ciertas especies y sus propiedades terapéuticas es desconocido y por ello es necesario investigar en recursos naturales, pero haciendo uso de métodos y técnicas que exige la investigación científica actual; así se podrán determinar principios activos y su aplicación en diversas partes del organismo.<sup>3</sup>

#### PROPÓLEO:

Es una resina de procedencia natural producida por las abejas, a partir de la mezcla de sustancia recogidas a partir de brotes, botones florales y exudados resinosos de plantas, logran formar un material pastoso que usan para cerrar huecos, embalsamar insectos muertos que se quedan atrapados en el interior de la colmena y además para protegerse de la invasión de insectos y microorganismos de diversa índole.<sup>4-7</sup>

Desde tiempos remotos hay reportes de culturas que hacían uso de propóleo para curar infecciones febriles; mientras que en Europa fue utilizado por franceses durante los siglos XIII y XIV para tratamiento de llagas. Sus propiedades terapéuticas se atribuyen a diversos

compuestos fenólicos, dentro de ellos, siendo los flavonoides los principales y algunos ácidos fenólicos, ésteres, aldehídos, alcoholes y cetonas que logran el efecto.<sup>5</sup>

El origen botánico define el color de la resina, se encuentran reportes de color verde pardo, castaño, rojizo o incluso casi negro.<sup>7</sup> Los estudios mencionan efectos como: actividad antiinflamatoria, bacteriostática, bactericida, cicatrizante, analgésica, anestésica y medicamento intracanal endodóntico.<sup>6,8,11-15,28</sup> Es de resaltar que la presencia de estos compuestos con estas actividades en el propóleo, pueden variar de una región a otra, ya que su presencia se asocia en parte a las resinas que las abejas recogen de las plantas presentes en el entorno.<sup>6,7</sup>

#### 2.2.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD BACTERIANA:

Se usan para el descubrimiento de nuevos fármacos, sustancias a base de extractos naturales como alternativa de nuevos antimicrobianos, permitiendo medir la epidemiología y resultado terapéutico. El estudio de la sensibilidad in vitro es uno de los requisitos previos para la eficacia in vivo de un tratamiento antibiótico. También es importante para realizar estudios sobre la evolución de las resistencias bacterianas. Los productos naturales son todavía una de las principales fuentes de nuevas moléculas de fármacos actuales.<sup>17-20</sup>

#### -MÉTODO DE DISCO EN AGAR:

Es el método oficial usado en laboratorios de microbiología para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana de rutina, pero se deben seguir las normas aceptadas y aprobadas por el instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI) para bacterias y levaduras en prueba, haciendo uso de medios de cultivo específicos, condiciones de incubación adecuadas para cada microorganismo y criterios válidos para las zonas de inhibición.<sup>20</sup>

“En este procedimiento las placas se inoculan con un inóculo estandarizado del microorganismo de ensayo. Entonces los discos de papel filtro (6 mm de diámetro) con el compuesto de ensayo a una concentración deseada, se colocan en la superficie de agar. Las placas de Petri se incuban en condiciones adecuadas. Generalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba y luego los diámetros de las zonas de crecimiento de inhibición se miden”.<sup>20</sup>

Para los estudios experimentales de bacterias se pueden usar medios de cultivo estándares como MHA, con un tamaño del inóculo (0,5 McFarland)  $(1-2) \times 10^8$  UFC / mL, a temperatura de  $35 \pm 2$ , por un tiempo de incubación de 16-18 horas.<sup>20</sup>

Antibiograma proporciona resultados cualitativos mediante la categorización de bacterias como susceptible, intermedia o resistente. Pero la inhibición del crecimiento bacteriano no significa la muerte bacteriana, este método no puede distinguir los efectos bactericidas y bacteriostáticos.<sup>20</sup>

“Además, el método de disco de agar no es apropiado para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), ya que es imposible para cuantificar la cantidad del agente antimicrobiano difundido en el medio de agar. Sin embargo, un MIC aproximada se puede calcular para algunos microorganismos y los antibióticos mediante la comparación de las zonas de inhibición con algoritmos almacenado”.<sup>20</sup> Este método ofrece ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo costo cuando se quieren probar varios antimicrobianos o diferentes concentraciones, capacidad de ensayar en un gran número de microorganismos, y la factibilidad de interpretación de resultados, por ello es de uso común para probar efectos antimicrobianos de plantas, aceites esenciales y fármacos.<sup>19,20</sup>

-CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI):

“Se definen como la concentración más baja de un agente antimicrobiano (en  $\mu\text{g/mL}$ ) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante 24

horas. La CMI es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos”.<sup>30-33</sup>

“La CMI se ha establecido como "Gold Standard" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado”.<sup>30, 33</sup>

#### -CONCENTRACION MINIMA BACTERICIDA (CMB):

Se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas). En ocasiones se hace necesario determinar la actividad bactericida de un agente antimicrobiano.<sup>30-33</sup>

Métodos para cuantificar la sensibilidad de un microorganismo ante una sustancia antimicrobiana:

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. Existen otro método basado en la difusión en agar: las tiras de E-test, consiste en unas tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antimicrobiano. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antimicrobiano difunde en el medio, y tras la incubación, se determina la CMI en el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento. Y a través de métodos automatizados.<sup>30,31</sup>

#### 2.2.3 BACTERIA INCLUIDA EN EL ESTUDIO:

El fracaso de tratamientos endodónticos se asocian a la persistencia de la infección microbiana en el sistema de conductos radiculares, los microorganismos pueden haber sobrevivido después de la preparación biomecánica del conducto o pueden haber hecho la

invasión por filtraciones a través de la corona dentaria. Las piezas dentarias con tratamientos endodónticos fallidos difieren de una microbiota Gram positiva y Gram negativa, siendo *E. faecalis* la especie que se aísla con mayor frecuencia.<sup>2,8,12</sup>

#### *Enterococcus Faecalis:*

Es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, inmóvil y no esporulado. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros y es habitante normal del tracto gastrointestinal humano. Esta bacteria ha atraído recientemente la atención de diversos investigadores porque ha sido identificada como una causa frecuente de infecciones periapicales persistentes.<sup>2,8</sup>

La temperatura óptima de crecimiento in vitro de este microorganismo es de 35°C, no obstante, se ha observado crecimiento entre 10°C y 45°C. Todas las cepas pueden crecer en medios que contengan esculina, la cual hidrolizan en presencia de sales biliares al 40% (medio agar bilis-esculina). Casi todas las cepas son homofermentativas, siendo el ácido láctico el producto final principal de la fermentación de la glucosa, no producen gas y no contienen enzimas citocrómicas. Una característica notable de *E. faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias, en particular zonas con altas concentraciones de sales (6,5% de Cloruro de Sodio), temperaturas extremas (15-60°C) y puede resistir además a la acción de colorantes como Azul de Metileno al 0,1%. Esta capacidad de resistencia por parte de *E. faecalis* en microambientes tóxicos está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes que han sido sometidos a tratamiento endodóntico y en los cuales los nutrientes son limitados, añadiéndose a esta situación el hecho de que algunos agentes antimicrobianos pudieran influir en que esta especie permanezca en los conductos de los dientes afectados.<sup>2,8</sup>

### **III.- HIPÓTESIS**

- H: Existe diferencia entre la efectividad antimicrobiana del extracto de propóleo comercial y propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*.

### **IV.-METODOLOGÍA**

#### **4.1.- Tipo de investigación:**

- Tipo cuantitativo

#### **4.2.- Nivel de investigación:**

- Nivel aplicativo

#### **4.3.- Diseño de investigación:**

- Según su observación a un mismo grupo de estudio y según un tiempo, es Longitudinal.
- Según lo establecido de relación de variables es Analítico.
- Según la observación a un tiempo futuro es Prospectivo.
- Según la intervención del investigador es Experimental.

#### 4.4.- Población y muestra:

##### A.- Población:

-Constituida por cepas de *Enterococcus faecalis* que fueron adquiridas por donación en el laboratorio de microbiología, Facultad de Medicina – Universidad Nacional de Trujillo.

##### B.- Muestra:

-La unidad de análisis estuvo constituida por cultivos de las cepas de *Enterococcus faecalis* que fueron donados del Laboratorio de Microbiología, Facultad de Medicina - Universidad Nacional de Trujillo.

-El tamaño muestra fue determinado mediante la fórmula estadística de comparación de medias en base a los datos de una muestra piloto seleccionada. (Anexo n° 3).

$$n = \frac{(\sigma_1 + \sigma_2)^2 * z^2}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2} = 24$$

$\sigma_1 = 2.576$ ; asumiendo un nivel de confianza del 99%

$\sigma_{1-\alpha} = 1.645$ ; asumiendo una potencia del 95%  $S =$

0.85; tomado de muestra piloto aplicada

$\bar{x}_1 = 11.63$ ; tomado de muestra piloto aplicada

$\bar{x}_2 = 10.88$ ; tomado de muestra piloto aplicada

El número mínimo de repeticiones obtenido fue de 24, sin embargo, para efectos de la presente investigación se consideraron 30 repeticiones por cada tipo de tratamiento a aplicar.

#### 4.5. Definición y operacionalización de variables.

Variables	Dimensiones	Indicadores	Valores Finales	Tipo	Escala de Medición
<b>Efecto antimicrobiano</b>	-----	Halos de inhibición	mm	Cuantitativo	De razón
<b>Tipos de propóleo</b>		10%, 20 % y 30 %	Propóleo etanólico serrano N° 1.  Propóleo Hidroalcohólico serrano N° 2.	Cualitativo	Nominal
		0.4%	Propóleo etanólico serrano N° 3.		
			Propóleo comercial		
<b>Concentración mínima inhibitoria</b>	-----	Método interposición de caldo.	Unidades formadoras de colonias.	Cuantitativo	De razón
<b>Características organolépticas</b>	-----	Método de observación y prueba	Olor Color y sabor.	Cualitativo	Nominal
<b>Determinación fisicoquímica</b>	Compuestos fenólicos Flavonoides Saponinas Quinonas Aceites esenciales	Método de marcha fotoquímica	Ausencia: Poca: +- Moderada: ++ Alta: +++	Cualitativo	Ordinal
<b>Tiempo de evaluación</b>		Método de observación	24 horas 48 horas 72 horas	Cualitativa	Ordinal

## **Definición Operacional de las Variables:**

1.- Efecto Antimicrobiano: Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis* debido a la presencia del de los extractos usados en el estudio.

2.- Tipos de Propóleos:

**Propóleo Serrano:** Resina que es obtenida a partir de la serranía más cercana a Trujillo, de la provincia de Sánchez Carrión y sus Zonas aledañas. Se colecciona a partir las colmenas de *Apis mellíferas* por apicultores a través del método por raspado y cuñas. Este es de color oscuro, de consistencia poco blanda, aspecto irregular, sabor amargo y picante, olor resinoso aromático.<sup>7</sup> Luego fue transportada para la preparación de la sustancia y distribuida de acuerdo a la metodología del estudio.

-Propóleo etanólico serrano N° 1: Sera el propóleo en maceración de 50g/200ml (propóleo/alcohol 96°), a concentraciones de: 10%, 20%, 30%.

- Propóleo hidroalcohólico serrano N° 2: Sera el propóleo en maceración de 50g/200ml (propóleo/alcohol 50°), a concentraciones de: 10%, 20%, 30%.

- Propóleo etanólico serrano N° 3: Sera el propóleo en maceración de 20g/25 ml, a concentración de 0.4% (propóleo/alcohol 96°).

**Extracto de propóleo comercial:** Sustancia a base del licor de caña y propóleo obtenida a partir de la casa comercial naturista Santa Natura. En de proveniencia de la amazonia peruana. Con la presentación de propiedades antimicrobianas, antivirales y antifúngico.

3.- Concentración Mínima Inhibitoria: Mínima concentración que inhibe el crecimiento visible de *Enterococcus faecalis* debido a la presencia del extracto de propóleo usado en el estudio después de una incubación de 24 y 48 horas.

4.- Caracterización organoléptica: Determinación de las características físicas del propóleo según la percepción de los sentidos: sabor, olor, color.

5.-Caracterización fitoquímica: Determinación de los compuestos químicos y metabolitos activos que se encuentra en el propóleo.

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

##### 6.6.1 De la obtención de los extractos de Propóleos:

En el estudio se utilizó 2 tipos de propóleos: uno de proveniencia comercial y otro propóleo proveniencia natural (extracto etanólico, elaborado en el laboratorio con fines de investigación).

- El propóleo comercial corresponden a la siguiente marca: Santa Natura. Se utilizó el producto a base de propóleo y licor de caña de baja graduación. (Ver fig. 1).
- El extracto de propóleo proveniente de la serranía fue obtenido a partir de los apicultores de la provincia de Sánchez Carrión y Zonas aledañas (Ver fig. 2). Se procedió a la elaboración del extracto etanólico en el laboratorio de farmacia de la Universidad Nacional de Trujillo.

a).- Preparación del extracto etanólico de la serranía: El propóleo en bruto fue extendido sobre una mesa y se separó de las impurezas, luego fue cortado en trozos pequeños.

- Propóleo etanólico serrano N° 1: Se pesó 50 g de propóleo cortado y se añadió 200 ml de alcohol de 96°, esta maceración se dejó reposar por 7 días, en un frasco ámbar (oculto de la luz y a temperatura ambiente). Luego filtro al vacío con papel Wattman número 40 y se obtuvo la solución etanólica del propóleo (Ver fig. 2,4,5,6). Después fue sometido en el rota vapor a 40°C para extraer el etanol y obtener un sólido de propóleo. Luego se prepararon las soluciones al 10%, 20%, 30%.
- Propóleo hidroalcohólico serrano N° 2: Se pesó 50 g de propóleo cortado y se añadió 200 ml de alcohol de 50° (este se preparó en el laboratorio con el control de un alcoholímetro), esta maceración se dejó reposar por 7 días, en un frasco ámbar (oculto de la luz y a temperatura ambiente). Luego filtró al vacío con papel Wattman número 40 y se obtuvo la solución etanólica del propóleo (Ver fig. 2,4,5,6). Después fue

sometido en la rota vapor a 40°C para extraer el etanol y obtener un sólido de propóleo. Luego se prepararon las soluciones al 10%, 20%, 30%.

- Propóleo etanólico serrano N° 3: Una cantidad aproximada a 40 g de propóleo se refrigeró a -0 °C por 24 horas. Luego se pulverizó en un mortero de porcelana, se pesaron 20 g de propóleo y se añadió 25 ml de alcohol de 96°, esta maceración se dejó reposar por 7 días, en un frasco ámbar (oculto de la luz y a temperatura ambiente). Luego filtró al vacío con papel Wattman número 40 y se obtuvo la solución etanólica del propóleo (Ver fig. 3,4,5,6). Después fue sometido a un rota vapor a 40°C para extraer el etanol y obtener un sólido de propóleo. Luego se obtuvo una preparación al 0.4% a partir de dicha maceración.

#### **4.6.2 De la obtención y cultivo de las cepas bacterianas:**

##### ***Enterococcus Faecalis:***

**-Reactivación:** La cepa fue reactivada incubándola en el caldo tioglicolato de sodio por 24 horas a 37°C estableciéndose su viabilidad por la turbidez del caldo, luego se hicieron diluciones hasta que se obtenga una turbidez semejante al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland (suspensión experimental) que corresponde a  $1 \times 10^8$  bacterias / ml.

**-Siembra de *Enterococcus faecalis* en placas de agar:** Las cepas de *Enterococcus faecalis* fueron cultivadas en medio agar Müller Hinton e incubadas a 37 °C por 24 horas en microanaerobiosis (5 a 10% de CO<sub>2</sub>) en jarra Gaspak. Se prepararon 30 placas, a las cuales se les rotuló según las concentraciones de propóleo serrano y comercial.

#### **4.6.3 Procedimiento:**

##### **Del efecto antimicrobiano:**

###### **A) Prueba de difusión de disco:**

- Se colocaron los discos de papel filtro Wattman 17 impregnados en 10 µl con las soluciones distribuidas en las placas Petri sembradas con cepa de *Enterococcus faecalis*. Luego se incubó nuevamente a 37 grados centígrados.
- Lectura de las placas: La lectura se realizó a las 24 horas, 48 horas, 72 horas. Se midieron halos de inhibición bacteriana en mm con un Vernier, donde se midió todo el radio generado alrededor del disco de papel impregnado con la sustancia evaluada y se anotaron en el anexo I.

###### **B) Concentración mínima inhibitoria:**

Se tomaron 10 tubos de ensayo con 2 ml de caldo de BHI en cada uno, al primero se le añade 2 ml de concentración de propóleo, a partir de esta se realizaron diluciones seriadas: 500mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62.5 mg/ml, 31,25 mg/ml, 15,625 mg/ml, 7,81mg/ml, 3,905mg/ml, 1,953 mg/ml, 0,976mg/ml. Posteriormente se inoculo 0.1 ml de solución bacteriana a una escala de turbidez de Mc. Farland N° 3 equivalente a  $9 \times 10^8$  UFC/ml para cada uno de los 10 tubos. Luego se incubó por un lapso de 24 horas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) es considerada aquella concentración del extracto en el cual es inhibido el crecimiento bacteriano (método de interposición de caldo). Se realizó el experimento solo en el propóleo etanólico serrano N° 1.

También se prepararon dos tubos de control: Uno contenía medio de cultivo más la cepa bacteriana y el otro medio de cultivo más cepa bacteriana y alcohol de 96°.

Pasado el lapso de incubación por 24 horas a 37 °C, se observó y se tomó 3 tubos los cuales no se apreció turbidez, a partir de estos se cogió 100 µl y con una asa Driglasky se dispersó

la muestra y las placas a incubación bajo las mismas condiciones, por 24 horas, luego se observó el crecimiento del microorganismo mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias, considerándose como concentración mínima inhibitoria en la cual no hubo crecimiento bacteriano o fue mínimo (máximo 5 colonias), lo mismo se repitió para las 48 horas .Se registraron los resultados en el anexo II.

#### **4.7. Plan de Análisis:**

Se determinó si la muestra tenía distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk, el ANOVA(Análisis de varianza), diferencia de medias para muestras relacionadas(Prueba t), asumiendo valores significativos para ( $p < 0,05$ ) y altamente significativos para ( $p < 0.01$ ); por otro lado se determinó medidas estadísticas descriptivas como media, desviación estándar, mínimo y máximo. También se construyeron intervalos de confianza al 95% para medias y diferencia de medias. Para ello se usó el programa estadístico IBM SPSS Vs 23.

#### 4.8.-Matriz de consistencia.

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	METODOLOGIA	POBLACIÓN
<p>Problema:</p> <p>¿Existe diferencia antimicrobiana entre el extracto de propóleo comercial vs propóleo de la serranía sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i>?</p>	<p><b>Objetivo general:</b> Comparar la efectividad antimicrobiana del extracto de propóleo comercial vs propóleo de la serranía sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i>.</p> <p><b>-Objetivos Específicos:</b></p> <p>1.-Determinar la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto de propóleo comercial sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i> según los tiempos de medición 24,48 y 72 horas.</p> <p>2.-Determinar la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico al 10 % ,20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i>, según los tiempos de medición 24,48 y 72 horas.</p> <p>3.-Determinar la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico al 10 % ,20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i>, según los tiempos de medición 24,48 y 72 horas.</p> <p>4.-Determinar la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico 0.4% de propóleo de la serranía sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i>, según los tiempos de medición 24,48 y 72 horas.</p> <p>5.- Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de la serranía N° 1 en diferentes concentraciones: 500mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 62.5 mg/ml, 31,25 mg/ml, 15,625 mg/ml, 7,81mg/ml, 3,905mg/ml, 1,953 mg/ml, 0,976mg/ml sobre cepas <i>Enterococcus faecalis</i>, después de 24 y 48 horas de incubación.</p> <p>6.-Determinar características organoléptica y fisicoquímica de propóleo serrano y comercial.</p>	<p>Hipótesis:</p> <p>Existe diferencia entre la efectividad antimicrobiana del extracto de propóleo comercial y propóleo de la serranía sobre cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i>.</p>	<p>Tipo:</p> <p>El presente trabajo es una investigación cuantitativa y de nivel aplicativo.</p> <p>Método: El método que utilizaremos es el experimental.</p> <p>Diseño de la investigación: El diseño de la presente investigación es de tipo experimental, prospectivo, longitudinal y analítico.</p>	<p>Constituida por UFC de <i>Enterococcus faecalis</i> que fueron adquiridas por donación en el laboratorio de microbiología, Facultad de Medicina – Universidad Nacional de Trujillo.</p>

## V.-RESULTADOS.

### 5.1.-Resultados:

**TABLA 1** Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto de propóleo comercial sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.

Diferencias relacionadas	Valor		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Media	Desviación típ.	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Halo de Inhibición a las 24 horas - Halo de Inhibición a las 48 horas	10.6	1.66	-0.67	0.71	-0.93	-0.4	-5.13	29	0.000
Halo de Inhibición a las 24 horas - Halo de Inhibición a las 72 horas	10.6	1.66	-0.22	0.72	-0.48	0.05	-1.66	29	0.108
Halo de Inhibición a las 48 horas - Halo de Inhibición a las 72 horas	11.27	1.69	0.45	0.38	0.31	0.59	6.5	29	0.000

a. Tratamiento = Propóleo Comercial

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

En la tabla 1, que evidencia las concentraciones promedio de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto etanólico de propóleo comercial sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* a las 24 horas de aplicación se logró un halo inhibitorio de  $10.6 \pm 1.66$  a las 48 horas un halo promedio de  $11.27 \pm 1.69$  y por último a las 72 horas un halo promedio de  $10.82 \pm 1.56$ . Al aplicar el extracto etanólico de propóleo comercial sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* se evidenció diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre las mediciones a las 24 horas con las de 48 horas con un incremento en el halo de inhibición de  $0.67 \pm 0.71$ ; Así mismo al comparar entre las 48 y 72 horas la diferencia también fue altamente significativa ( $p < 0.01$ ), evidenciándose que entre hubo una reducción de  $0.45 \pm 0.38$ ; resultados contrarios se evidenciaron al comparar los halos de inhibición entre las 24 y 72 horas la diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ), evidenciándose que dicha reducción fue de  $0.22 \pm 0.72$ , como lo muestra la tabla 01.

**TABLA 2** Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico serrano N° 1 de propóleo sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.

	Momento	n	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		F	Sig.
					Límite inferior	Límite superior		
24 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 10%	30	9.92	2.94	8.82	11.01	11.79	0.000
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 20%	30	11.4	2.57	10.44	12.36		
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 30%	30	13.18	2.28	12.33	14.04		
	Total	90	11.5	2.91	10.89	12.11		
48 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 10%	30	10.73	2.95	9.63	11.83	9.7	0.000
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 20%	30	12.08	2.37	11.2	12.97		
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 30%	30	13.72	2.53	12.77	14.66		
	Total	90	12.18	2.87	11.58	12.78		
72 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 10%	30	10.67	2.97	9.56	11.78	9.22	0.000
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 20%	30	11.3	2.33	10.43	12.17		
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 30%	30	13.4	2.39	12.51	14.29		
	Total	90	11.79	2.81	11.2	12.38		

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

En la tabla 2 se evidencia que los mayores halos fueron obtenidos al aplicar el Propóleo Natural Etanólico al 30% a las 48 horas de aplicación con un promedio de  $13.72 \pm 2.53$ ; seguido por el mismo extracto y bajo la misma concentración a las 72 horas con un promedio de  $13.40 \pm 2.39$ . Por el contrario la menor efectividad la alcanzaron el extracto de Propóleo Natural Etanólico al 10% con un promedio de  $9.92 \pm 2.94$  a las 24 horas seguido del mismo pero a las 72 horas con un promedio de  $10.67 \pm 2.97$ , según evidenciamos en la tabla 02. Además, se muestra que existe diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre las diferentes concentraciones de extracto etanólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* tanto a las 24, 48 y 72 horas de haberseles aplicado las concentraciones.

**TABLA 3** Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico serrano N° 2 de propóleo sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.

	Momento / Concentración	n	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		F	Sig.
					Límite inferior	Límite superior		
<b>24 horas</b>	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	30	15.72	3	14.6	16.84	1.57	0.210
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	30	15.3	3.11	14.14	16.46		
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	30	14.45	2.29	13.6	15.3		
	Total	90	15.16	2.84	14.56	15.75		
<b>48 horas</b>	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	30	16.8	2.95	15.7	17.9	1.9	0.160
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	30	16.12	3.37	14.86	17.37		
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	30	15.32	2.45	14.4	16.23		
	Total	90	16.08	2.98	15.45	16.7		
<b>72 horas</b>	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	30	16.05	2.72	15.04	17.06	1.96	0.150
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	30	15.62	3.15	14.44	16.79		
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	30	14.67	2.39	13.77	15.56		
	Total	90	15.44	2.8	14.86	16.03		

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

De la tabla 3 se evidencia que los mayores halos fueron obtenidos al aplicar el Propóleo Natural Hidroalcohólico al 10% a las 24 horas de aplicación con un promedio de  $16.80 \pm 2.95$ ; seguido por el mismo extracto y con una concentración de 20% en el mismo momento con un promedio de  $16.12 \pm 3.37$ . Por el contrario la menor efectividad la alcanzaron el extracto de Propóleo Natural Hidroalcohólico al 30% con un promedio de  $14.45 \pm 2.29$  a las 24 horas seguido de la misma concentración pero a las 72 horas con un promedio de  $14.67 \pm 2.39$ , según evidenciamos en la presente tabla.

Además, se muestra que no existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las diferentes concentraciones de extracto de Propóleo Natural Hidroalcohólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* tanto a las 24, 48 y 72 horas de haberseles aplicado las diferentes concentraciones.

**TABLA 4** Evaluación de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico serrano N° 3 de propóleo sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.

	Valor		Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación tip.	Media	Desviación tip.	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Halo de Inhibición a las 24 horas	14.48	1.95	-0.98	0.81	-1.29	-0.68	-6.61	29	0.000
- Halo de Inhibición a las 48 horas	15.47	2.18							
Halo de Inhibición a las 24 horas	14.48	1.95	-0.55	0.95	-0.9	-0.2	-3.17	29	0.004
- Halo de Inhibición a las 72 horas	15.03	2.19							
Halo de Inhibición a las 48 horas	15.47	2.18	0.43	0.63	0.2	0.67	3.79	29	0.001
- Halo de Inhibición a las 72 horas	15.03	2.19							

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

En la tabla 4 se evidencia las concentraciones promedio de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto etanólico serrano N° 3 de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* a las 24 horas de aplicación se logró un halo inhibitorio de  $14.48 \pm 1.95$  a las 48 horas un halo promedio de  $15.47 \pm 2.18$  y por último a las 72 horas un halo promedio de  $15.03 \pm 2.19$ .

Al aplicar el extracto etanólico serrano N° 3 de propóleo sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* se evidenció diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre las mediciones a las 24 horas con las de 48 horas con un incremento en el halo de inhibición de  $0.98 \pm 0.81$ ; Así mismo al comparar entre las 24 y 72 horas la diferencia también fue altamente significativa ( $p < 0.01$ ), evidenciándose que entre hubo un incremento de  $0.55 \pm 0.95$ ; finalmente al comparar los halos de inhibición entre las 48 y 72 horas la diferencia también fueron altamente significativa ( $p < 0.01$ ), evidenciándose que dicha reducción fue de  $0.43 \pm 0.6$ .

**TABLA 5 Concentración mínima inhibitoria del extracto de propóleo natural etanólico N° 1.**

Tubo / Concentración	Placa 1 (24 Horas)	Placa 2 (48 Horas)
tubo 8 ; 125 mg/ml	31	10
tubo 9 ; 250 mg/ml	12	7
tubo 10 ; 500 mg/ml	1	1

**Fuente: Análisis de laboratorio**

En la tabla 5 se observa las CMI del propóleo etanólico de la serranía tras la evaluación de 24 y 48 horas de incubación. Resultando la concentración de 500 mg/ml del tubo numero 10 como la CMI de cepas de *Enterococcus faecalis*.

**TABLA 6 Determinación de las características organolépticas y físico químicas.**

Características Organolépticas del Propóleos ensayados		COLOR	SABOR	OLOR	
Extracto de propóleo natural etanólico N° 1: 50g / 200 ml (alcohol de 96°)		Marrón oscuro	Amargo	Olor propio de propóleo	
Extracto de propóleo natural hidroalcohólico N° 2: 50g / 200 ml (alcohol de 50°)		Castaño claro	Ligeramente picante	Aromático	
Extracto de propóleo natural etanólico N° 3: 20g / 25 ml (alcohol de 96°)		Castaño oscuro	Ligeramente amargo	Ligeramente aromático	
Extracto propóleo comercial		Castaño oscuro	Picante	Aromático	
	Extracto de propóleo natural etanólico N° 1	Extracto de propóleo natural hidroalcohólico N° 2	Extracto de propóleo natural etanólico N° 3	Extracto de propóleo comercial	ENSAYO
COMPUESTOS FENÓLICOS	+++	++	++	+	<b>Cloruro férrico</b>
FLAVONOIDES	+++	++	++	++	<b>Shinoda</b>
SAPONINAS	-	+-	-	+-	<b>Espuma</b>
QUINONAS	++	++	-	-	<b>Borntrager</b>
ACEITES ESCENCIALES	++	-	+-	-	<b>Sudan</b>

\* Ausencia: - Poca: +- Moderada: ++ Alta: +++

**Fuente: Análisis de laboratorio**

En la tabla 6 se evidencia las características organolépticas de cada muestra de extracto etanólico e hidroalcohólico provenientes de la sierra después del filtrado al vacío y extracto de propóleo comercial(EPC). Observándose también que el extracto de propóleo serrano que presentó alta presencia de compuestos fenólicos y flavonoides fue el extracto de propóleo serrano N° 1, mientras que el N°2, N° 3 y EPC mostraron moderada presencia. Se muestra poca presencia de saponinas en el extracto de propóleo serrano n° 2 y EPC, mientras que el extracto de propóleo serrano N° 1 y N° 3 mostraron ausencia. El extracto de propóleo serrano N° 1 y n° 2 mostraron poca presencia de quinonas, mientras que el extracto de propóleo serrano N° 3 y EPC mostraron ausencia. Extracto de propóleo serrano N° 1 y N° 3 mostraron presencia de aceites esenciales entre moderada y poca respectivamente, mientras que el extracto de propóleo serrano N° 2 y EPC mostraron ausencia.

## 5.1.- ANALISIS DE RESULTADOS

En el presente estudio se ha demostrado que el propóleo tiene capacidad antibacteriana y que esta se debe a los compuestos fisicoquímicos que este posee, pues el lugar de procedencia del producto influye sustancialmente en el efecto antimicrobiano, esta será más compleja dependiendo del lugar y la vegetación circundante al sitio de recolección del producto.<sup>24,25</sup>

El propóleo de la serranía posee mayor efecto antimicrobiano vs el propóleo comercial frente a cultivos de *Enterococcus faecalis*. Estos resultados pueden ser debidos a que en el análisis fitoquímico realizado a ambos propóleos, se encontraron altos porcentajes de compuestos activos como fenoles, flavonoides, saponinas, quinonas y aceites esenciales en el propóleo de la serranía, mientras que en el propóleo comercial el porcentaje de estos compuestos activos fue menor. La composición química de propóleos relatada por varios estudios es a base: aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, amino ácidos, ácidos y ésteres aromáticos, chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares.<sup>13,22,34</sup> De todos los compuestos, se le atribuye que las actividades antimicrobianas son relacionadas a los compuestos fenólicos y flavonoides ya que estos compuestos están en mayor porcentaje en el producto.<sup>13,31</sup> Aunque se relata que la unión de todos estos genera un efecto sinérgico para lograr el efecto antimicrobiano, el mecanismo de acción es complejo ya que puede desorganizar el citoplasma, pared celular, membrana plasmática, inhibición de la síntesis proteica y a través de la inhibición de la división celular por inhibición de la replicación de ADN.<sup>18,35</sup> Estos datos nos permiten avalar a los resultados encontrados pues a mayor concentración de compuestos activos, mayor es el efecto antibacteriano.

El extracto de propóleo de la serranía logró superior efectividad antimicrobiana vs el propóleo comercial sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, por lo cual se observó que a mayor concentración y tiempo de exposición en casi la mayoría de porcentajes de extractos

evaluados el efecto antimicrobiano era considerable. El antecedente nacional de Jara R<sup>29</sup> (2014), avala los resultados obtenidos en este presente estudio, pues también halló que el propóleo proveniente de origen natural logra efecto antimicrobiano mayor al que es obtenido de una casa comercial, aunque en su estudio uso propóleo proveniente de un lugar distinto al nuestro y lo ensayo en microorganismos *Streptococcus sanguinis* y *Mutans*.

Extracto etanólico de propóleo de la serranía n° 1 y n° 3 demostraron efectividad antimicrobiana generando halos inhibitorios crecientes a medida que la concentración era mayor, se observó también que los halos inhibitorios se mantuvieron e incluso hubo algunos que incrementaron a medida que las horas de observación pasaban, es decir de 24, 48 y 72 horas. El estudio de Palomino, et al<sup>22</sup>, respalda los resultados obtenidos en el presente estudio, pues también indica que a mayor concentración de propóleo mayor es el halo de inhibición obtenido. El estudio de Aguirre<sup>18</sup>, también evaluó el efecto antimicrobiano del propóleo de proveniencia comercial en comparación con el paramonoclorofenol, los porcentajes ensayados fueron de 5%, 70% y 90% y se observaron estos halos a las 24, 48 y 72 horas, estableciéndose no variación de los halos entre los tiempos de observación, estos resultados no concuerdan con los obtenidos por el presente estudio, ya que se encontró incremento de halos inhibitorios a medida que las horas de observación pasaban, aunque es necesario señalar que los porcentajes ensayados de 70% y 90% son distintos a los ensayados por este estudio, por ello puede ser que a mayor concentración no exista variación en cuanto a la generación de halos inhibitorios observados en los distintos tiempos.

Los extractos etanólicos y hidroalcohólico ensayados en el presente estudio lograron halos inhibitorios que fueron incrementando a medida que la concentración era mayor, y en cuanto a la observación de tiempos (24, 48, 72 h.) los halos inhibitorios de los extractos etanólicos aumentaron desde la primera observación hasta la última, mientras que el extracto hidroalcohólico mantuvo halos inhibitorios similares durante todos tiempos de observación.

El estudio de Carrillo, et al <sup>21</sup> evaluó extractos de propóleo etanólicos y acuosos, obteniendo como resultado que los etanólicos son los que tienen efectividad antibacteriana significativamente mayor; Tolosa y Cañizares<sup>27</sup>, también reporta que la efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, indicando que los extractos etanólicos son los más efectivos y además actúan en menores concentraciones a diferencia de los acuosos que necesitan porcentajes mayores para logra su efecto. Estos datos respaldan a los obtenidos en el presente estudio, ya que los extractos etanólicos lograron mayores halos inhibitorios para el cultivo de *E. faecalis*. EEP n° 1 a la concentración del 30% logro los mayores halos inhibitorios en las 48 y 72 horas observación y la concentración al 10 % mostro los menores halos inhibitorios en las 24 y 72 horas de observación.

El extracto hidroalcohólico de propóleo de la serranía al 10%, 20% y 30% demostró efecto antimicrobiano sobre cultivos de *E. faecalis* a través de la formación de halos inhibitorios diferentes entre cada concentración, pero no se halló diferencia entre los tiempos de 24, 48 y 72 horas de observación. Las concentraciones al 10% logro 16.80 mm, al 20% logro 16.12 mm y 30% logro 14.45 mm de halos inhibitorios tras la evaluación a las 24 y 48 horas, Alvares M<sup>19</sup>, reporta un extracto de propóleo hidroalcohólico de procedencia natural(Huaraz), ensayando su efectividad antimicrobiana a porcentajes de 25%,50%,75% y 100% obteniendo halos inhibitorios de 8.56 mm, 11.81 mm, 11.67 mm, 12.63 mm para cada porcentaje evaluado, estos resultados al evaluarse con los obtenidos por el presente estudio se evidencia mayores halos inhibitorios a pesar que las concentraciones evaluadas son menores; otro estudio de Gonzalón L<sup>20</sup>, también evaluó extracto hidroalcohólico de procedencia natural(Ecuador), obteniendo halos inhibitorios de 14.8 mm para concentración al 10% y 12.4 mm para la concentración al 20%, comparando estas dos concentraciones y sus medias de halos inhibitorios obtenidos con los del presente estudio se puede apreciar que nuestros resultados superan a los resultados obtenidos por Gonzalón L<sup>20</sup>.

Aguirre<sup>18</sup> evaluó porcentajes mayores a los evaluados por el presente estudio y se logra apreciar que los halos obtenidos por el EHP al 10%, 20% y 30% generan halos inhibitorios más altos a pesar que las concentraciones del presente estudio son menores a las estudiadas por Aguirre, y esto se pudo haber dado por el origen del propóleo usado por Aguirre fue comercial y no indican el solvente usado en la extracción del extracto, pues como ya se ha establecido en diversos estudios que extractos de propóleo preparados en laboratorio son mucho más efectivos y logran efecto antimicrobiano en menores cantidades, por contener mayores metabolitos activos los cuales son responsables del efecto antimicrobiano. El efecto antimicrobiano del propóleo depende de su lugar de procedencia, por ello se infiere a partir de los resultados analizados que el propóleo de procedencia natural de la sierra Libertena posee más alto contenido de metabolitos activos por ello se puede apreciar halos inhibitorios mayores a las concentraciones evaluadas.<sup>6,7</sup> El estudio de Marmanillo G.<sup>24</sup> reporta que una concentración del 5% de propóleo tras la observación después de 72 horas dio un halo próximo al encontrado en el presente estudio, pero la concentración fue al 30% siendo mayor a la usada por Marmanillo, pero es necesario recalcar que la bacteria de estudio son distintas, probablemente el *E. faecalis* requiera de mayor porcentaje de propóleo para ser erradicada.

La CMI del extracto etanólico de propóleo de la serranía n° 1 para inhibir el crecimiento de cepas *Enterococcus faecalis*, fue la concentración de 500mg/ml. Salaverry, et al<sup>26</sup> (2011), obtuvo como resultados que la CMI para la cepa de *E. faecalis* es de 256 g/ml con diluyente de alcohol de 99%, contrastando con nuestros resultados podemos evidenciar que se obtuvo una CMI menor en comparación por la obtenida por Salaverry, ya que la de nosotros establecimos CMI a partir de mg, mientras que Salaverry estableció CMI a partir de gramos. El estudio de Lugo E, et al<sup>17</sup> presenta CMI de 400mg/ml y lo detalla como actividad moderada frente a *E. faecalis*, esta resulta ser mucho más cercana a la establecida en el presente estudio.

## VI.- CONCLUSIONES.

- El antimicrobiano más efectivo sobre cultivo de *Enterococcus faecalis* es el extracto de propóleo de la serranía en comparación con el extracto de propóleo comercial.
- Se determinó el efecto antimicrobiano del EPC, a través de la formación de halos inhibitorios que se mantuvieron desde las 24 horas hasta las 72 horas, el halo de mayor inhibición fue obtenido a las 48 horas de evaluación, resultando altamente significativo ( $p < 0.01$ ).
- Se determinó el efecto antimicrobiano del EEP de la serranía al 10%, 20% y 30, a través de la formación de halos inhibitorios, observándose incrementos de halos inhibitorios a medida que la concentración era mayor, los cuales se mantuvieron en los tiempos de observación de 24, 48 y 72 horas, resultando diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ).
- Se determinó el efecto antimicrobiano del EHP de la serranía al 10%, 20% y 30%, a través de la formación de los halos inhibitorios, el efecto fue aumentando a medida que la concentración era mayor, pero dio lo mismo entre la medición de tiempos 24, 48 y 72 horas, el EHP al 10% resultó el de mejor efecto con medias relativamente altas comparadas con las demás, resultando diferencia no significativa entre los tratamientos aplicados ( $p > 0.05$ ).
- Se determinó el efecto antimicrobiano del EEP de la serranía al 0.4%, a través de la formación de halos inhibitorios que fueron incrementando a medida del pasar de las horas, dando resultados altamente significativos entre la medición de 24 – 48, 24 -72 y 48-72 horas, resultando altamente significativo ( $p < 0.01$ ).
- Se consideró la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de propóleo de la serranía n° 1 a la concentración de 500mg/ml por lograr inhibir el crecimiento de cepas *Enterococcus faecalis* (menor de 5 colonias bacterianas) tras la incubación de 24 y 48 horas.

- Los compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, quinonas y aceites esenciales se encontraron en mayor número en los extractos de propóleo de la serranía en comparación con los encontrados en el propóleo comercial.

## **VII.-RECOMENDACIONES.**

Se recomienda establecer protocolos de ejecución a partir de los resultados obtenidos y establecer trabajos de investigación in vitro verificando los resultados y posteriormente poder aplicarlo en estudios In Vivo.

Se recomienda hacer estudios sobre propóleos provenientes de distintas zonas geográficas, para comparar el de mayor acción antimicrobiana.

Se recomienda realización de estudios con otros microorganismos específicos que sean obtenidos de pacientes que presenten infecciones en la cavidad oral de diversa índole.

Se recomienda evaluar cuál de los compuestos que se encontraron en el propóleo son responsables del efecto antibacteriano contra *Enterococcus faecalis*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Serrano H, Sánchez M, Cardona Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. Rev CES odontol(revista de la internet).2015(citado el 02 de marzo del 2016);28(2):112-118. Disponible en: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/articula/viewFile/3681/2487>
- 2.-Pardi G, Guilarte C, Cardozo E, Briceño. Detención de Enterococcus faecalis en dientes con fracaso en el tratamiento endodòntico.Act odontol venez. 2009; 47(1).
- 3.- Editorial. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, vol. 1, núm. 2, julio, 2002, pp. 6-7.
- 4.-Farre R, Frassetto I, Sanchez A. El propolis y la salud. Ars pharmaceutica(revista de la internet).2004(citado el 02 de mayo del 2016);45(1):21-43.Disponible en: <http://www.ugr.es/~ars/abstract/45-21-04.pdf>
- 5.- Tinoco V, Quesada J, Maldonado M, Oliver R, Luna B. Muerte leucocitaria por toxicidad del propóleo. Rev odont mex (revista en la Internet). 2013(Citado el 16 de setiembre del 2015); 17( 3 ): 161-165. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-199X2013000300005&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-199X2013000300005&lng=es).
- 6.-Moreno Z, Martínez P, Figueroa A. Efecto antimicrobiano in vitro de propóleo colombiano y cubano sobre streptococos mutan ATCC 25175.Art product invest.2007;70-75.
- 7.- Sosa A, Martín A, Subovsky M, Castillo A. Métodos de recolección de propóleos: su incidencia en rendimiento y calidad. Agroecología 10.2003.Disponible en: [http://baunne.unne.edu.ar/revista\\_agroecologia/pdfs/AG\\_10\\_03\\_Sosaetal.pdf](http://baunne.unne.edu.ar/revista_agroecologia/pdfs/AG_10_03_Sosaetal.pdf)

- 8.-A comparative evaluation of the antibacterial efficacy of propolis, 3.0 % sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate against *Enterococcus faecalis*-An in vitro study. Disponible en: <http://medind.nic.in/eaat/t07/i2/eaat07i2p31.pdf>
- 9.- Carrero C, González M, Martínez A, Serna F, Díez H, Rodríguez A. Baja frecuencia de *Enterococcus faecalis* en mucosa oral de sujetos que acuden a consulta odontológica. Rev fac odontol univ antioq. 2015; 26( 2 ): 261-270.
- 10.- Solórzano D. Estudio comparativo in vitro sobre el efecto antibacteriano de propóleo, paramonoclorofenol alcanforado e hidróxido de calcio en necrosis pulpar. Tesis para optar título de cirujano dentista. Universidad de Huánuco. Huánuco – Perú.2011.152pp.
- 11.-Boonsai P, Phuwaprai P, Chanchao C. Antibacterial Activity of a Cardanol from Thai *Apis mellifera* Propolis. Int j med sci (Internet). 2014(Citado el 15 de octubre del 2014); 11(4):327-336. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3936026/>
- 12.- Oncaq O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. Gen dent. 2006; 54(5): 319-22.
- 13.- Premoli G, Laguado P, Días N, Romero C, Villareal J, González J. Uso del propóleo en odontología. Rev odont venez(Internet) .2010(Citada el 16 de octubre del 2014);48(2). Disponible en : <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art22.asp>
- 14.- Mattigatti S, Ratnakar P, Moturi S, Varma S, Rairam S. Antimicrobial effect of conventional root canal medicaments vs propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. J contemp dent pract. 2012; 13(3):305-309.
- 15.- Ferreira F, Aparecido S, Pereira da Silva O, et al. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod(Internet). 2007(Citado el 16 de octubre del 2014);104(5):709-716. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17964476>

16.- Koru O, Toksoyb F, Han C, et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anaerobe(Internet). 2007(Citado el 16 de octubre del 2014);13(1): 140–145. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475517>

17.- Lugo E, García M, Navarro M, Velázquez C, Robles R. Actividad antibacteriana de extractos de propòleo en aislados clínicos de Staphylococcus aureus y Enterococcus faecalis. Epistemus(Revista en la internet).2012(citado el 05 de julio del 2017);13(6): 39-43. Disponible en: file:///C:/Users/roberto/Downloads/numero13.pdf

18.-Aguirre N. Acción antimicrobiana para inhibir el Enterococcus faecalis: análisis in vitro de dos medicamentos de uso externo, paramonoclorofenol y propòleo. Proyecto de tesis como requisito para la obtención del título de Odontólogo. Universidad central del ecuador. Quito, Ecuador. 2015. Pp 59.

19.- Alvares M. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanòlico de Propolis de Apis Mellífera (Propòleo) frente a Enterococcus Faecalis ATCC 29212.Tesis para obtener el grado de maestro en estomatología. Universidad Privada Antenor Orrego. Trujillo, Perú. 2014. Pp 54.

20.-Gonzalón L. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano como medicamento intraconducto entre el hidróxido de calcio y el extracto de propòleo sobre el Enterococcus faecalis. Proyecto previo a la obtención del título de odontólogo. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 2015. Pp 83.

21.- Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propòleos de la huasteca Potosina. Info tecnol (Intenet). 2011(Citado el 10 de octubre del 2014);22(5):21-28. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642011000500004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642011000500004&script=sci_arttext)

- 22.- Palomino L, Martínez García C, Gil J, Durango D. Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleo en el Municipio de La Unión. Rev fact nac de agronom –medell(Internet). 2010(Citada el 15 de octubre del 2014); 63(1): 5373-5383. Disponible en:<http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n1/a13v63n01>
- 23.-Marmanillo G. Comparación in vitro de la acción antimicrobiana del propóleo, hidróxido de calcio y la combinación de estos frente al *Streptococcus*. Tesis título de cirujano dentista. Cuzco, Perú. Universidad Andina del Cuzco.2012.145 pp.
- 24.- Dos Santos C, Arcenio F, Carvalho E, et al. Optimizaçãõ do processo de extraçãõ de própolis através da verificaçãõ da atividade antimicrobiana. Rev bras(Internet). 2003(Citado el 10 de octubre del 2014);13(1):71-74. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v13s1/a27v13s1.pdf>
- 25.- Manrique A. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado de Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. Zootec Tropic (Internet). 2006(Citado el 8 de octubre del 2014);24(1):43-53. Disponible en: <http://www.bioline.org.br/request?zt06004>
- 26.- Salaverry G, Fernández L, Romero M. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos (EEP) frente Enterococcus faecalis y bacterias anaerobias.Endodon (Internet). 2011(citado el 01 de mayo del 2016);29(2):70-74. Disponible en: <http://www.worldcat.org/title/actividad-antimicrobiana-de-extractos-etanolicos-de-propoleos-eep-frente-enterococcus-faecalis-y-bacterias-anaerobias/oclc/820633320>
- 27.- Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars pharmac (internet).2002(citado el 01 de mayo del 2016);43(1-2):37-55.Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/233.pdf>
- 28.- Suleman T, Van Vuuren S, Sandasi M, Viljoen A. Antimicrobial activity and chemometric modelling of South African propolis. J appl microbial(revista en la

internet).2015(Citado el 01 de mayo del 2016); 119(4):981-90.Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26189549>

29. Jara R. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propoleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans*(ATCC 25175) Y *Streptococcus sanguinis*(ATCC 10556). Tesis para optar el título de cirujano dentista. Universidad peruana de ciencias aplicadas. Lima, Perú. 2014. Pp 75.

30.-Andrews J. Determination of minimum inhibitory concentrations. J of Antimicrob Chemother (revista de la internet).2001(Citado el 16 de octubre del 2015);48 (Suppl. 1):5-16.Disponible en : [http://jac.oxfordjournals.org/content/48/suppl\\_1/5.fiull.pdf+html](http://jac.oxfordjournals.org/content/48/suppl_1/5.fiull.pdf+html)

31.- Barry A, Craig W, Nadler H, Barth L, Sanders C, Swenson J. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved guideline.1999.

32.- Soriano F. Aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos para la lectura interpretada del antibiograma. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(7):461–466

33.- Mounyr B, Moulay S, Saad I. Metodos for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J pharmac analysis (revista en la internet).2016(citado el 16 de junio del 2017);6(2):71-79.Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

34.-Marcucci M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologi (revista en la internet).1995(citado el 26 de setiembre del 2016);26: 83-89. Disponible en: [https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1995/02/Apidologie0044-8435\\_1995\\_26\\_2\\_ART0002/Apidologie\\_0044-8435\\_1995\\_26\\_2\\_ART0002.html](https://www.apidologie.org/articles/apido/abs/1995/02/Apidologie0044-8435_1995_26_2_ART0002/Apidologie_0044-8435_1995_26_2_ART0002.html)

35. Mayta F, Sacsquispe S, Ceccarelli J, Alania J. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. Rev Estomatol Herediana. 2012;22(1):50-58.

36.-Brushi M, Franco S, Gremiao M. Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies.2003; 26(14): 2399-2409.

# ANEXOS

N<sup>a</sup> Placa Petri

N<sup>o</sup>

## ANEXO 01.

### Ficha de recolección de datos.

Evaluación - Halos Inhibición								
Sustancias ensayadas	Propóleo Natural etanólico N <sup>o</sup> 1 Al 10%	Propóleo Natural etanólico N <sup>o</sup> 1 Al 20%	Propóleo Natural etanólico N <sup>o</sup> 1 Al 30%	Propóleo Natural hidroalcohólico N <sup>o</sup> 2 al 10%	Propóleo Natural hidroalcohólico N <sup>o</sup> 2 al 20%	Propóleo Natural hidroalcohólico N <sup>o</sup> 2 al 30%	Propóleo Natural etanólico N <sup>o</sup> 3 al 0.4%	Propóleo Comercial
24 horas								
48 horas								
72 horas								

\*Sera medido en mm con valores +/-.

Se llenará de acuerdo al propóleo ensayado en cada placa:

- Propóleo natural N<sup>o</sup> 1: 10%,20%,30%
- Propóleo natural hidroalcohólico N<sup>o</sup>2: 10%,20%,30%.
- Propóleo natural N<sup>o</sup> 3: 0.4%
- Propóleo comercial.

\*A cada muestra se le número del 1 al 8 para rotulación de las placas.

## ANEXO 02.

### Ficha de recolección de datos – Propóleo etanólico natural N° 1.

<b>Tubos</b>	<b>Concentraciones</b>	<b>Horas de medición 24 h.</b>	<b>Horas de medición 48 h.</b>
10	500 mg/ ml		
9	250 mg/ml		
8	125 mg/ml		
7	62,5 mg/ml		
6	31,25 mg/ml		
5	15,625 mg/ml		
4	7,81mg/ml		
3	3,905mg/ml		
2	1,953 mg/ml		
1	0,976mg/ml		
Control 1	Alcohol 96%		
Control 2	Solo agar		

\*Se llenara: si hubo turbidez o no se evidencio turbidez.

### ANEXO 03.

#### BASE DE DATOS DE MUESTRA PILOTO PARA CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

A las 24 horas de aplicación							
<b>Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%</b>	<b>Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%</b>	<b>Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%</b>	<b>Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%</b>	<b>Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%</b>	<b>Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%</b>	<b>Propóleo Natural etanólico N° 3 al 0.4%</b>	<b>Propóleo Comercial</b>
10.5	14.5	15	15	17	14	15.5	12
8	9.5	9.5	14	13	18	12	10.5
15	10	14.5	14.5	19	16.5	16	10
13	11	13	16	16	14	16	11

Fuente: Datos de laboratorio

**ANEXO N° 04.**

**Figuras:**



**Figura 1: Propóleo de la serranía.**



**Figura 2: Tabla y cuchillo: propóleo en trozos pequeños.**



**Figura 3: Mortero y pilón: propóleo en proceso de pulverizado.**



**Figura 4: Se rotularon de acuerdo peso y solución etanólica de maceración.**



**Figura 5: Técnica al vacío de filtrado de los extractos.**



**Figura 6: Extractos etanólicos: Muestra 1: 50g/50ml, muestra 2: 50g/50ml y extracto Hidroalcohólico de propóleo de la serranía: Muestra 3: 20g/25ml.**



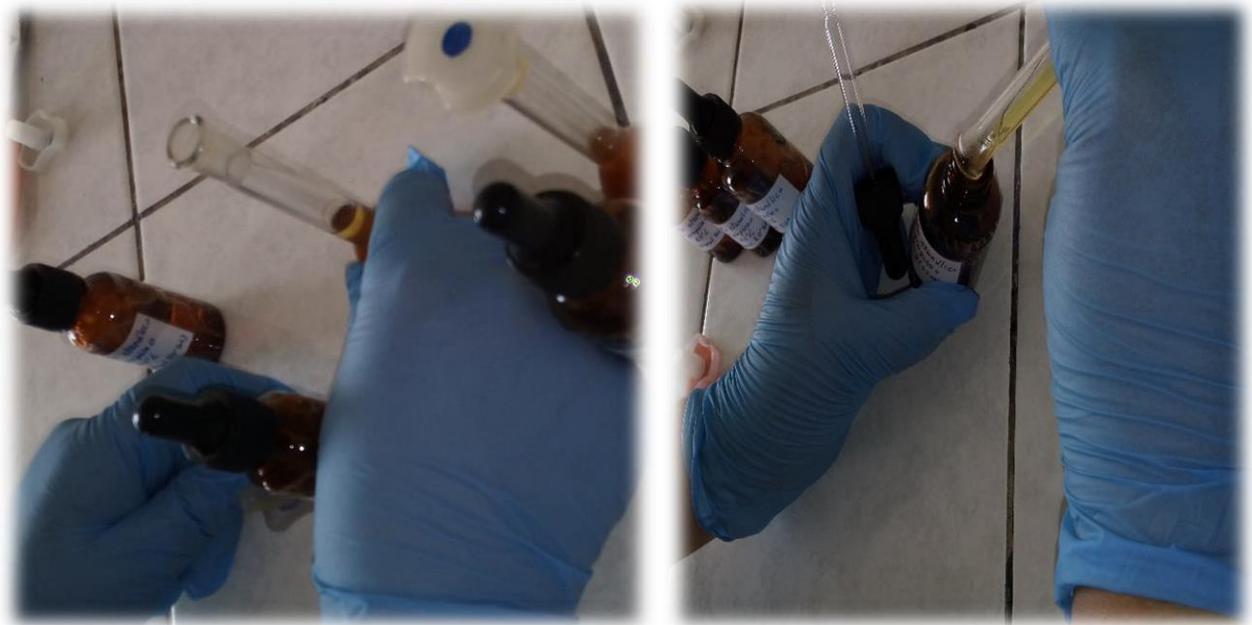
**Figura 7: Extracto n° 1 en sus tres porcentajes: 10%,20%,30%.**



**Figura 8: Extracto n° 2 en sus tres porcentajes: 10%,20%,30%.**



**Figura 9: Extracto n° 3 en su porcentaje preparado: 0.4% a partir de 20mg/25ml (macerado)**



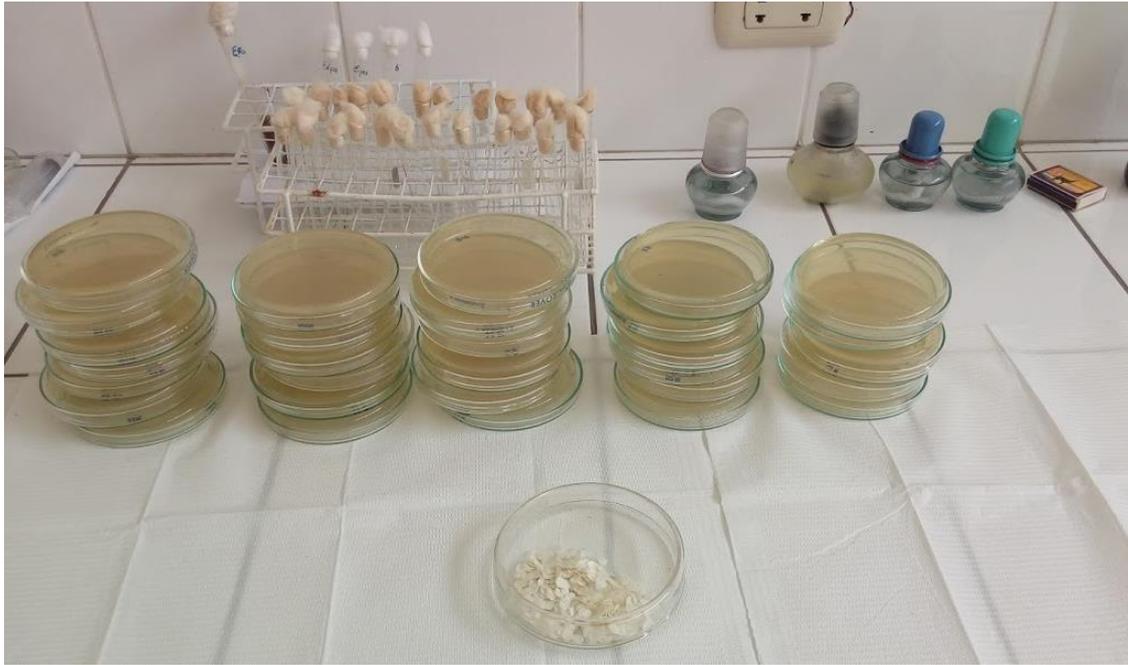
**Figura 10: Vaciado de los extractos en sus concentraciones de trabajo.**



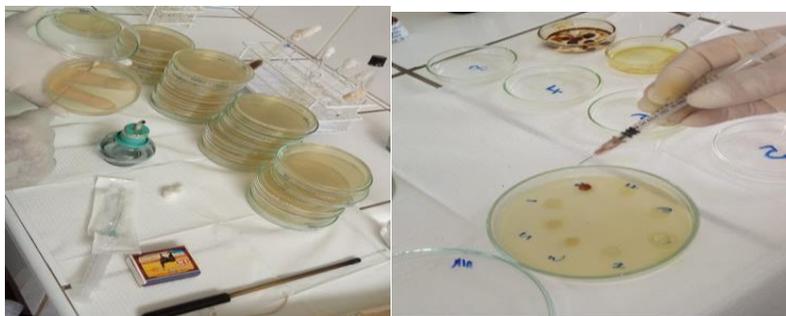
**Figura 11: Muestras que se usaran en el ensayo de efectividad antimicrobiana.**



**Figura 12: Caracterización fitoquímica de los propóleos ensayados.**



**Figura 13: Material preparado para el ensayo de efectividad antimicrobiana.**



**Figura 14: Material para el efecto antimicrobiano- antibiograma.**



**Figura 15: Placa mostrando los halos de inhibición a las 24 y 48 horas.**



**Figura 16: Ensayo de concentración mínima inhibitoria.**

**ANEXO N° 05.**

**ANÁLISIS DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA A TRAVÉS DE LA FORMACIÓN DEL HALO INHIBITORIO QUE GENERA EL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO COMERCIAL SOBRE CULTIVOS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, SEGÚN LOS TIEMPOS DE MEDICIÓN 24, 48 Y 72 HORAS.**

**TABLA 1A Prueba para muestras relacionadas para evaluar la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto etanólico de propóleo comercial sobre cultivos de *E. faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

Diferencias relacionadas	Diferencias relacionadas				t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
			Inferior	Superior			
Halo de Inhibición a las 24 horas - Halo de Inhibición a las 48 horas	-0.67	0.71	-0.93	-0.4	-5.13	29	0.000
Halo de Inhibición a las 24 horas - Halo de Inhibición a las 72 horas	0.22	0.72	-0.48	0.05	-1.66	29	0.108
Halo de Inhibición a las 48 horas - Halo de Inhibición a las 72 horas	0.45	0.38	0.31	0.59	6.5	29	0.000

a. Tratamiento = Propóleo Comercial

En la Tabla 01A, que evidencia las concentraciones promedio de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto etanólico de propóleo comercial sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* a las 24 horas de aplicación se logró un halo inhibitorio de  $10.6 \pm 1.66$  a las 48 horas un halo promedio de  $11.27 \pm 1.69$  y por último a las 72 horas un halo promedio de  $10.82 \pm 1.56$ . Al aplicar el extracto etanólico de propóleo comercial sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* se evidenció diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre las mediciones a las 24 horas con las de 48 horas con un incremento en el halo de inhibición de  $0.67 \pm 0.71$ ; Así mismo al comparar entre las 48 y 72 horas la diferencia también fue altamente significativa ( $p < 0.01$ ), evidenciándose que entre hubo una reducción de  $0.45 \pm 0.38$ ; resultados contrarios se evidenciaron al comparar los halos de inhibición entre las 24 y 72 horas la diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ), evidenciándose que dicha reducción fue de  $0.22 \pm 0.72$ , como lo muestra la tabla 01A.

**TABLA 2A Estadísticas descriptivas de la efectividad antimicrobiana a través de la formación los halos inhibitorios que genera el extracto etanólico de propóleo comercial sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

	Media	n	Desviación típ.
Halo de Inhibición a las 24 horas	10.60	30	1.66
Halo de Inhibición a las 48 horas	11.27	30	1.69
Halo de Inhibición a las 72 horas	10.82	30	1.56

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

**ANALISIS DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA A TRAVÉS DE LA FORMACIÓN DEL HALO INHIBITORIO QUE GENERA EL PREPARADO DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 10 %, 20%, 30% DE PROPÓLEO DE LA SERRANÍA SOBRE CULTIVOS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, SEGÚN LOS TIEMPOS DE MEDICIÓN 24, 48 Y 72 HORAS.**

**TABLA 3A Efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: halo de inhibición

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	38174,600 <sup>a</sup>	9	4241.62	624.79	0.00
Momento	20.82	2	10.41	1.53	0.22
Tratamiento	410.51	2	205.25	30.23	0.00
Tratamiento Momento	* 6.74	4	1.68	0.25	0.91
Error	1771.90	261	6.79		
Total	39946.50	270			

a. R cuadrado = .956 (R cuadrado corregida = .954)

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

De la tabla 3A se evidencia que la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* tiene diferencia altamente significativa de concentración a concentración ( $p < 0.01$ ), efecto contrario se tuvo al analizar los efectos antibacterianos de los tiempos de medición a las 24, 48 y 72 horas no se evidenciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Además, al analizar la significancia entre las diferentes interacciones de los tratamientos con los diferentes momentos de aplicación de los tratamientos (concentraciones al 10%, 20% y 30%) se evidencia que tampoco hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Por otro lado, el modelo propuesto explica un 95.4% de los efectos en la eficacia antimicrobiana medida a través de los halos de inhibición, lo cual indica que si es un modelo con buen ajuste.

**TABLA 4A Pruebas de falta de ajuste del modelo**

Variable dependiente:halo\_inhibición

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Falta de ajuste	6,739	4	1,685	,248	,911
Error puro	1771,900	261	6,789		

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

Además, se realizó la prueba de falta de ajuste, evidenciándose que si existe buen ajuste del modelo según se muestra en la tabla 04.

Por otro lado, se evidencia que los mayores halos fueron obtenidos al aplicar el Propóleo Natural Etanólico al 30% a las 48 horas de aplicación con un promedio de  $13.72 \pm 2.53$ ; seguido por el mismo extracto y bajo la misma concentración a las 72 horas con un promedio de  $13.40 \pm 2.39$ . Por el contrario, la menor efectividad la alcanzaron el extracto de Propóleo Natural Etanólico al 10% con un promedio de  $9.92 \pm 2.94$  a las 24 horas seguido del mismo, pero a las 72 horas con un promedio de  $10.67 \pm 2.97$ , según evidenciamos en la tabla 05A.

Además, en la tabla 6A se muestra que existe diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre las diferentes concentraciones de extracto etanólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* tanto a las 24, 48 y 72 horas de haberseles aplicado las concentraciones.

**TABLA 5A Estadísticas descriptivas de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

	Momento	n	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
24 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 10%	30	9.92	2.94	0.54	8.82	11.01	5.00	15.00
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 20%	30	11.40	2.57	0.47	10.44	12.36	6.00	15.00
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 30%	30	13.18	2.28	0.42	12.33	14.04	9.00	16.00
	Total	90	11.50	2.91	0.31	10.89	12.11	5.00	16.00
48 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 10%	30	10.73	2.95	0.54	9.63	11.83	7.00	16.00
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 20%	30	12.08	2.37	0.43	11.20	12.97	7.00	16.00
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 30%	30	13.72	2.53	0.46	12.77	14.66	8.00	17.50
	Total	90	12.18	2.87	0.30	11.58	12.78	7.00	17.50
72 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 10%	30	10.67	2.97	0.54	9.56	11.78	7.00	17.00
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 20%	30	11.30	2.33	0.43	10.43	12.17	7.00	15.00
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 al 30%	30	13.40	2.39	0.44	12.51	14.29	8.00	17.50
	Total	90	11.79	2.81	0.30	11.20	12.38	7.00	17.50

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

**TABLA 6A Análisis de varianza de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**  
ANOVA

halo_inhibición						
Momento		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
24 horas	Inter-grupos	160.52	2	80.26	11.79	0.00
	Intra-grupos	592.48	87	6.81		
	Total	753.00	89			
48 horas	Inter-grupos	133.91	2	66.95	9.70	0.00
	Intra-grupos	600.25	87	6.90		
	Total	734.16	89			
72 horas	Inter-grupos	122.82	2	61.41	9.22	0.00
	Intra-grupos	579.17	87	6.66		
	Total	701.99	89			

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

**TABLA 07: Prueba de homogeneidad de varianzas.**  
Prueba de homogeneidad de varianzas

Halo de inhibición				
Momento	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
24 horas	2.02	2	87	0.14
48 horas	2.01	2	87	0.14
72 horas	1.86	2	87	0.16

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

La tabla 07 evidencia la prueba de homogeneidad de varianzas nos muestra que las varianzas de los tratamientos son homogéneas, por lo cual si aplica en el estudio realizar las pruebas paramétricas para la comparación múltiple de los tratamientos según momentos de aplicación.

**TABLA 08 Comparaciones múltiples de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

**Comparaciones múltiples**

halo\_inhibición DMS

Momento	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
24 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	-1,4833*	0.67	0.03	-2.82	-0.14
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	-3,2667*	0.67	0.00	-4.61	-1.93
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	-1,7833*	0.67	0.01	-3.12	-0.44
48 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	-1,3500*	0.68	0.05	-2.70	0.00
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	-2,9833*	0.68	0.00	-4.33	-1.64
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	-1,6333*	0.68	0.02	-2.98	-0.29
72 horas	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	-0.63	0.67	0.34	-1.96	0.69
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	-2,7333*	0.67	0.00	-4.06	-1.41
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	-2,1000*	0.67	0.00	-3.42	-0.78

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

Al comparar las concentraciones de Propóleo Natural Etanólico en sus diferentes concentraciones a las 24 horas, observamos que existe diferencia significativa entre las concentraciones al 10% y 30% así como al 20% y 30%, en menor escala se encontró una diferencia significativa entre las concentraciones al 10% y 20%. En todas ellas los halos fueron mayores a medida que las concentraciones se incrementaban.

A las 48 horas de haberse aplicado las concentraciones los resultados fueron similares a los hallados a las 24 horas, sin embargo al comparar a las 72 horas de aplicados los extractos se evidenció que no existe diferencia significativa entre las concentraciones al 10% con las concentraciones 20%.

**ANÁLISIS DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA A TRAVÉS DE LA FORMACIÓN DEL HALO INHIBITORIO QUE GENERA EL PREPARADO DE EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO AL 10 %, 20%, 30% DE PROPÓLEO DE LA SERRANÍA SOBRE CULTIVOS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, SEGÚN LOS TIEMPOS DE MEDICIÓN 24, 48 Y 72 HORAS.**

**TABLA 09 Efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

**Variable dependiente: halo inhibición**

<b>Origen</b>	<b>Suma de cuadrados tipo III</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Modelo corregido	128,169 <sup>a</sup>	8	16.021	1.977	0.050
Intersección	65364.448	1	65364.448	8064.789	0.000
Tratamiento	87.319	2	43.659	5.387	0.005
Momento	40.052	2	20.026	2.471	0.086
Tratamiento * Momento	.798	4	.200	.025	0.999
Error	2115.383	261	8.105		
Total	67608.000	270			
Total corregida	2243.552	269			

a. R cuadrado = .057 (R cuadrado corregida = .028)

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

De la tabla 09 se evidencia que la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* tiene diferencia altamente significativa de concentración a concentración ( $p < 0.01$ ), efecto contrario se tuvo al analizar los efectos antibacterianos de los tiempos de medición a las 24, 48 y 72 horas no se evidenciaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Además, al analizar la significancia entre las diferentes interacciones de los tratamientos con los diferentes momentos de aplicación de los tratamientos (concentraciones al 10%, 20% y 30%) se evidencia que tampoco hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Por otro lado, el modelo propuesto explica un 2.8% de los efectos en la eficacia antimicrobiana medida a través de los halos de inhibición, lo cual indica que no es un modelo con buen ajuste, lo que también se evidencia en la tabla 10 cuando probamos que si existe un mal ajuste de los datos respecto al modelo propuesto.

**TABLA 10 Pruebas de falta de ajuste del modelo**

**Variable dependiente:halo\_inhibición**

<b>Origen</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Falta de ajuste	0.80	4	0.20	0.02	0.999
Error puro	2115.38	261	8.10		

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

Por otro lado, se evidencia que los mayores halos fueron obtenidos al aplicar el Propóleo Natural Hidroalcohólico al 10% a las 24 horas de aplicación con un promedio de  $16.80 \pm 2.95$ ; seguido por el mismo extracto y con una concentración de 20% en el mismo momento con un promedio de  $16.12 \pm 3.37$ . Por el contrario, la menor efectividad la alcanzaron el extracto de Propóleo Natural Hidroalcohólico al 30% con un promedio de  $14.45 \pm 2.29$  a las 24 horas seguido de la misma concentración, pero a las 72 horas con un promedio de  $14.67 \pm 2.39$ , según evidenciamos en la tabla 11.

**TABLA 11 Estadísticas descriptivas de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

	Momento	n	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
<b>24 horas</b>	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	30	15.72	3.00	0.55	14.60	16.84	9.0	21.0
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	30	15.30	3.11	0.57	14.14	16.46	6.5	19.5
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	30	14.45	2.29	0.42	13.60	15.30	8.5	21.0
	Total	90	15.16	2.84	0.30	14.56	15.75	6.5	21.0
<b>48 horas</b>	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	30	16.80	2.95	0.54	15.70	17.90	10.0	22.0
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	30	16.12	3.37	0.61	14.86	17.37	6.0	20.5
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	30	15.32	2.45	0.45	14.40	16.23	9.0	21.0
	Total	90	16.08	2.98	0.31	15.45	16.70	6.0	22.0
<b>72 horas</b>	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	30	16.05	2.72	0.50	15.04	17.06	10.0	21.0
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	30	15.62	3.15	0.57	14.44	16.79	6.0	20.5
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	30	14.67	2.39	0.44	13.77	15.56	9.0	21.5
	Total	90	15.44	2.80	0.29	14.86	16.03	6.0	21.5

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

**TABLA 12 Análisis de varianza de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

Momento		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
24 horas	Inter-grupos	25.01	2	12.50	1.57	0.21
	Intra-grupos	692.82	87	7.96		
	Total	717.82	89			
48 horas	Inter-grupos	33.07	2	16.54	1.90	0.16
	Intra-grupos	755.88	87	8.69		
	Total	788.96	89			
72 horas	Inter-grupos	30.04	2	15.02	1.96	0.15
	Intra-grupos	666.68	87	7.66		
	Total	696.72	89			

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

Además, en la tabla 12 se muestra que no existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre las diferentes concentraciones de extracto de Propóleo Natural Hidroalcohólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* tanto a las 24, 48 y 72 horas de haberseles aplicado las diferentes concentraciones.

**TABLA 13 Prueba de homogeneidad de varianzas.**

**Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error<sup>a</sup>**

Variable dependiente: halo inhibición

F	gl1	gl2	Sig.
1.625	8	261	0.118

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intersección + Tratamiento + Momento + Tratamiento \* Momento

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

La tabla 13 evidencia la prueba de homogeneidad de varianzas nos muestra que las varianzas de los tratamientos son homogéneas, por lo cual si aplica en el estudio realizar las pruebas paramétricas para la comparación múltiple de los tratamientos según momentos de aplicación.

**TABLA 14 Comparaciones múltiples de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto hidroalcohólico al 10 %, 20%, 30% de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas. (Prueba DMS)**

Momento	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza
						Límite inferior
24 horas	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	0.42	0.73	0.569	-1.03
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	1.27	0.73	0.086	-0.18
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	0.85	0.73	0.247	-0.60
48 horas	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	0.68	0.76	0.372	-0.83
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	1.48	0.76	0.055	-0.03
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	0.80	0.76	0.296	-0.71
72 horas	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	0.43	0.71	0.546	-0.99
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	1.38	0.71	0.056	-0.04
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	0.95	0.71	0.187	-0.47

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

Al comparar las concentraciones de Propóleo Natural Hidroalcohólico en sus diferentes concentraciones a las 24 horas, observamos que no existe diferencia significativa entre las concentraciones al 10% y 30% así como al 20% y 30%, ni tampoco entre las concentraciones al 10% y 20%. Los efectos fueron similares en los 3 momentos de observación de los halos de inhibición (24, 48 y 72 horas) como evidencia la tabla 14

**ANÁLISIS DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA A TRAVÉS DE LA FORMACIÓN DEL HALO INHIBITORIO QUE GENERA EL PREPARADO DE EXTRACTO ETANÓLICO 20MG/2ML DE PROPÓLEO DE LA SERRANÍA SOBRE CULTIVOS DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, SEGÚN LOS TIEMPOS DE MEDICIÓN 24, 48 Y 72 HORAS.**

**TABLA 15 Prueba para muestras relacionadas para evaluar la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico 20mg/2ml de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

		Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
					Inferior	Superior			
Par 1	Halo de Inhibición a las 24 horas - Halo de Inhibición a las 48 horas	-0.98	0.81	0.15	-1.29	-0.68	-6.61	29	0.000
Par 2	Halo de Inhibición a las 24 horas - Halo de Inhibición a las 72 horas	-0.55	0.95	0.17	-0.90	-0.20	-3.17	29	0.004
Par 3	Halo de Inhibición a las 48 horas - Halo de Inhibición a las 72 horas	0.43	0.63	0.11	0.20	0.67	3.79	29	0.001

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

**TABLA 16 Estadísticas descriptivas de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el preparado de extracto etanólico 20mg/2ml de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*, según los tiempos de medición 24, 48 y 72 horas.**

	Media	n	Desviación típ.	Error típ. de la media
Halo de Inhibición a las 24 horas	14.48	30	1.95	0.36
Halo de Inhibición a las 48 horas	15.47	30	2.18	0.40
Halo de Inhibición a las 72 horas	15.03	30	2.19	0.40

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

En la tabla 15, evidencia las concentraciones promedio de la efectividad antimicrobiana a través de la formación del halo inhibitorio que genera el extracto etanólico 20mg/2ml de propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* a las 24 horas de aplicación se logró un halo inhibitorio de  $14.48 \pm 1.95$  a las 48 horas un halo promedio de  $15.47 \pm 2.18$  y por último a las 72 horas un halo promedio de  $15.03 \pm 2.19$ . Al aplicar el extracto etanólico 20mg/2ml de propóleo sobre cultivos de *Enterococcus faecalis* se evidenció diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre las mediciones a las 24 horas con las de 48 horas con un incremento en el halo de inhibición de  $0.98 \pm 0.81$ . Así mismo al comparar entre las 24 y 72 horas la diferencia también fue altamente significativa ( $p < 0.01$ ),

evidenciándose que entre hubo un incremento de  $0.55 \pm 0.95$ ; finalmente al comparar los halos de inhibición entre las 48 y 72 horas la diferencia también fueron altamente significativa ( $p < 0.01$ ), evidenciándose que dicha reducción fue de  $0.43 \pm 0.63$ , como lo muestra la tabla 16.

**TABLA 17: PRUEBAS DE NORMALIDAD SEGÚN TRATAMIENTO Y MOMENTO**

Tratamiento		Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
<b>Halo de Inhibición a las 24 horas</b>	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	0.21	30	0.002	0.89	30	0.006
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	0.15	30	0.071	0.93	30	0.043
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	0.24	30	0.000	0.83	30	0.000
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	0.23	30	0.000	0.90	30	0.010
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	0.19	30	0.008	0.92	30	0.020
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	0.19	30	0.007	0.92	30	0.023
	Propóleo Natural etanólico N° 3 al 0.4%	0.20	30	0.004	0.88	30	0.002
	Propóleo Comercial	0.19	30	0.006	0.94	30	0.075
<b>Halo de Inhibición a las 48 horas</b>	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	0.22	30	0.001	0.86	30	0.001
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	0.17	30	0.027	0.95	30	0.193
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	0.25	30	0.000	0.88	30	0.003
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	0.24	30	0.000	0.87	30	0.002
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	0.19	30	0.006	0.91	30	0.016
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	0.25	30	0.000	0.84	30	0.000
	Propóleo Natural etanólico N° 3 al 0.4%	0.18	30	0.012	0.90	30	0.010
	Propóleo Comercial	0.24	30	0.000	0.90	30	0.007
<b>Halo de Inhibición a las 72 horas</b>	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	0.21	30	0.001	0.85	30	0.001
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	0.15	30	0.078	0.94	30	0.097
	Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	0.23	30	0.000	0.89	30	0.006
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	0.27	30	0.000	0.89	30	0.005
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	0.15	30	0.090	0.93	30	0.062
	Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	0.19	30	0.005	0.88	30	0.003
	Propóleo Natural etanólico N° 3 al 0.4%	0.12	30	.200*	0.96	30	0.362
	Propóleo Comercial	0.26	30	0.000	0.83	30	0.000

\*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

**TABLA 18: PRUEBAS DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZA SEGÚN TRATAMIENTO APLICADO.**

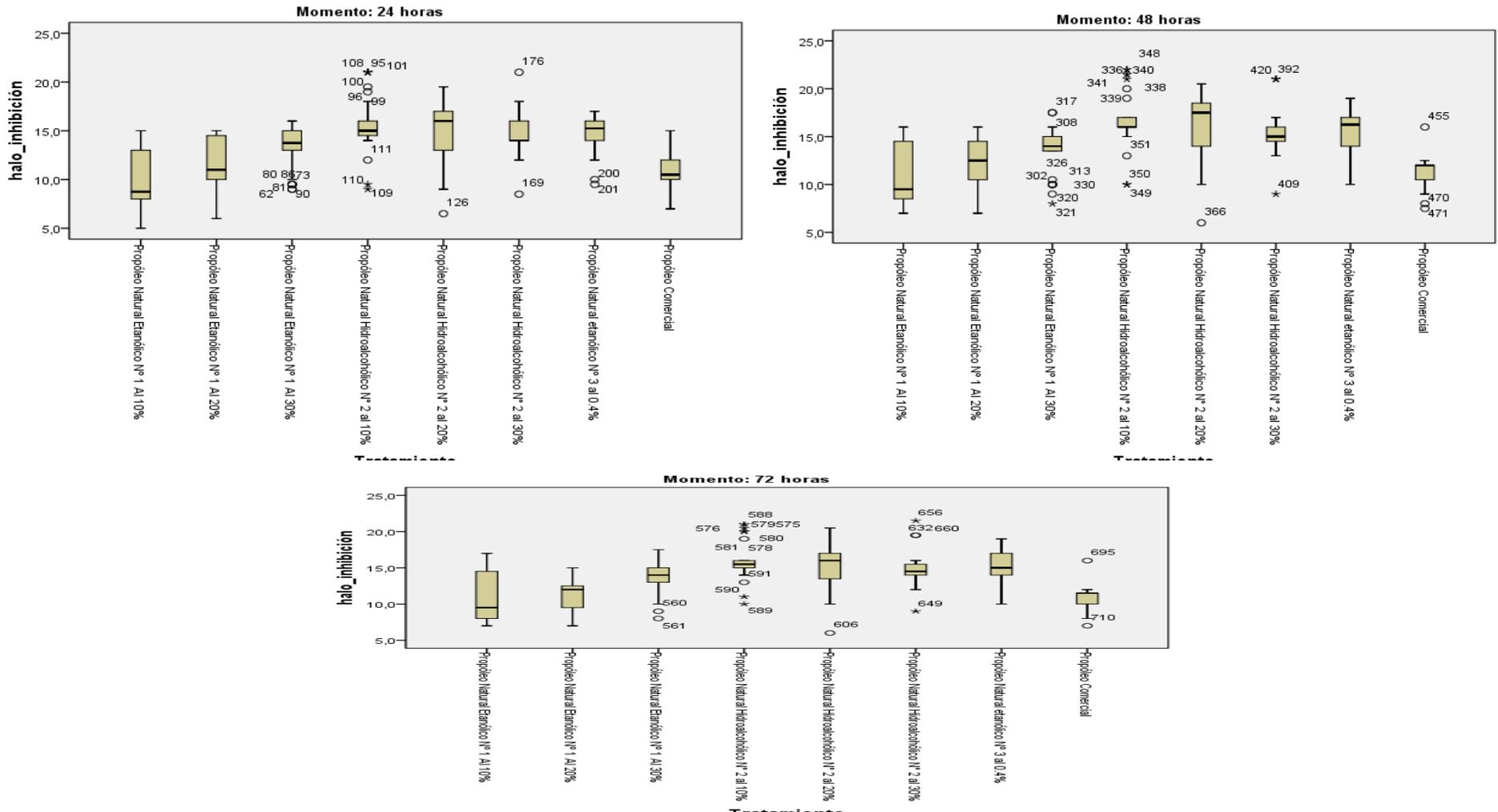
**Prueba de homogeneidad de varianzas**  
halo\_inhibición

<b>Tratamiento</b>	<b>Estadístico de Levene</b>	<b>gl1</b>	<b>gl2</b>	<b>Sig.</b>
Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 10%	0.01	2	87	0.99
Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 20%	0.16	2	87	0.85
Propóleo Natural Etanólico N° 1 Al 30%	0.04	2	87	0.96
Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 10%	0.08	2	87	0.93
Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 20%	0.22	2	87	0.80
Propóleo Natural Hidroalcohólico N° 2 al 30%	0.01	2	87	0.99
Propóleo Natural Etanólico N° 3 al 0.4%	0.19	2	87	0.83
Propóleo Comercial	0.28	2	87	0.76

FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.

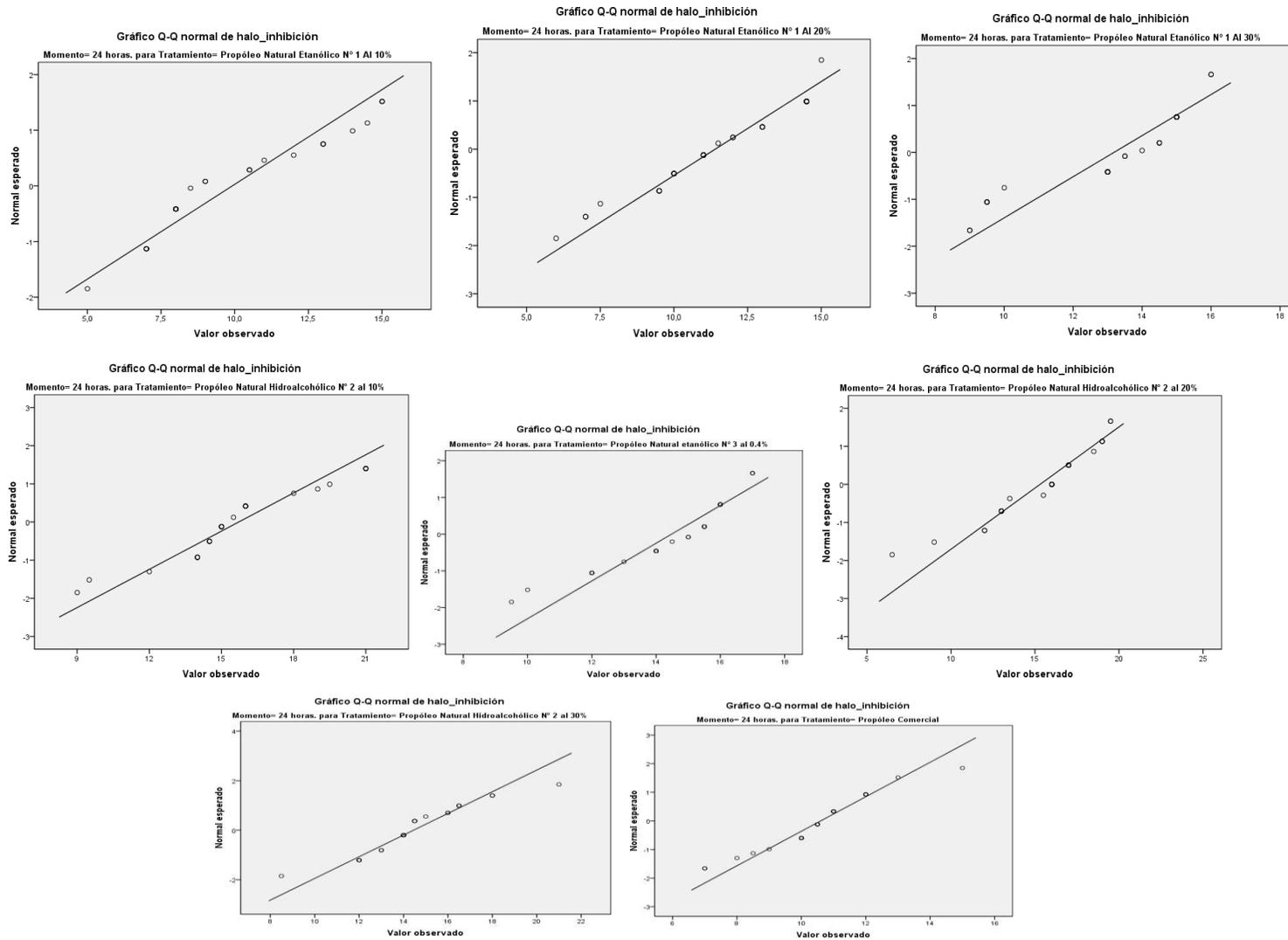
**ANEXO N° 06.**

**FIGURA i : DIAGRAMAS DE CAJAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE TRATAMIENTOS APLICADOS SEGÚN MOMENTO A LAS 24, 48 Y 72 HORAS**



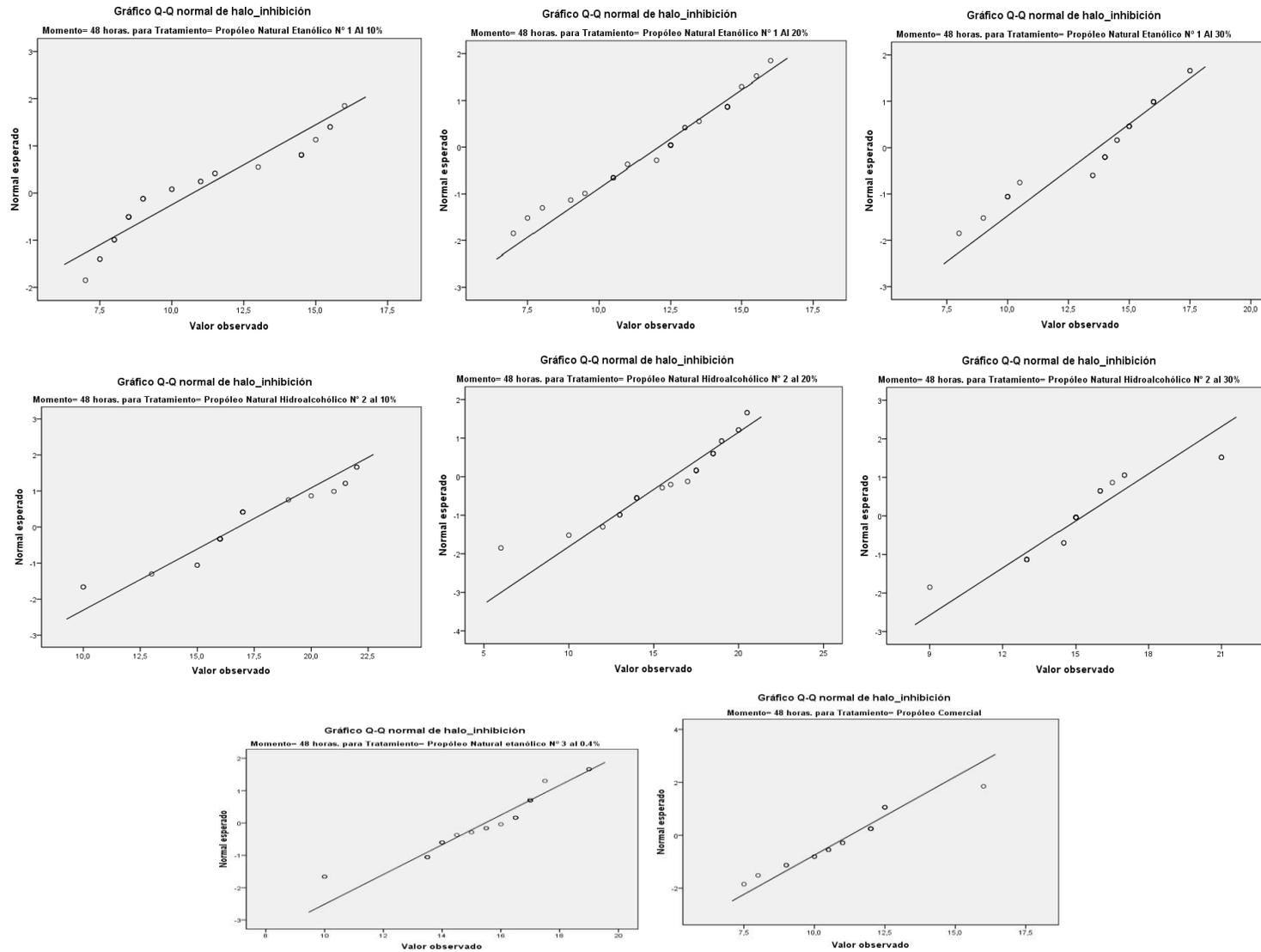
**FUENTE:** Base de datos de ensayos de laboratorio.

**FIGURA ii : Gráficos de normalidad de los tratamientos a las 24 horas de aplicación de los tratamientos:**



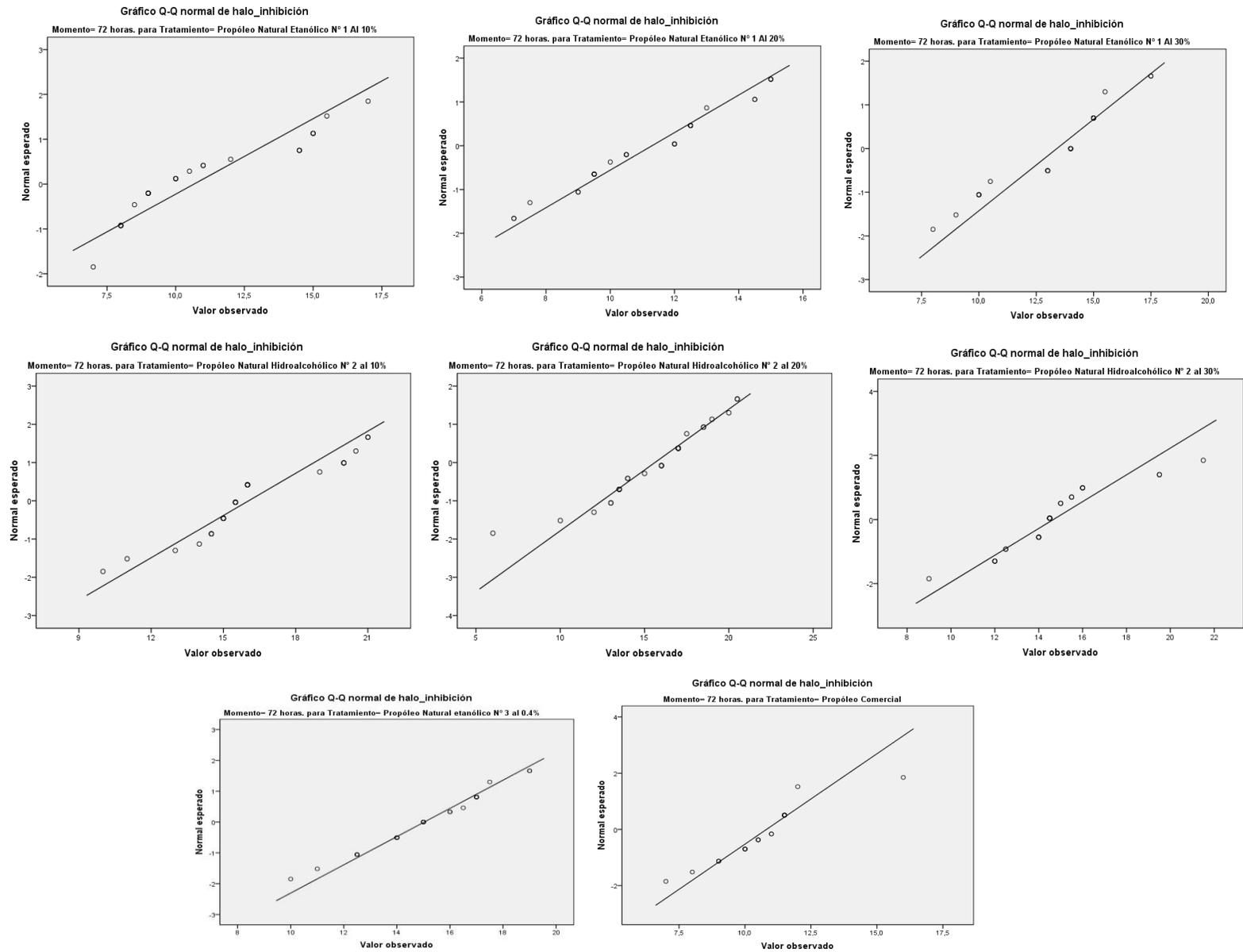
**FUENTE:** Base de datos de ensayos de laboratorio.

**FIGURA iii : Gráficos de normalidad de los tratamientos a las 48 horas de aplicación de los tratamientos:**



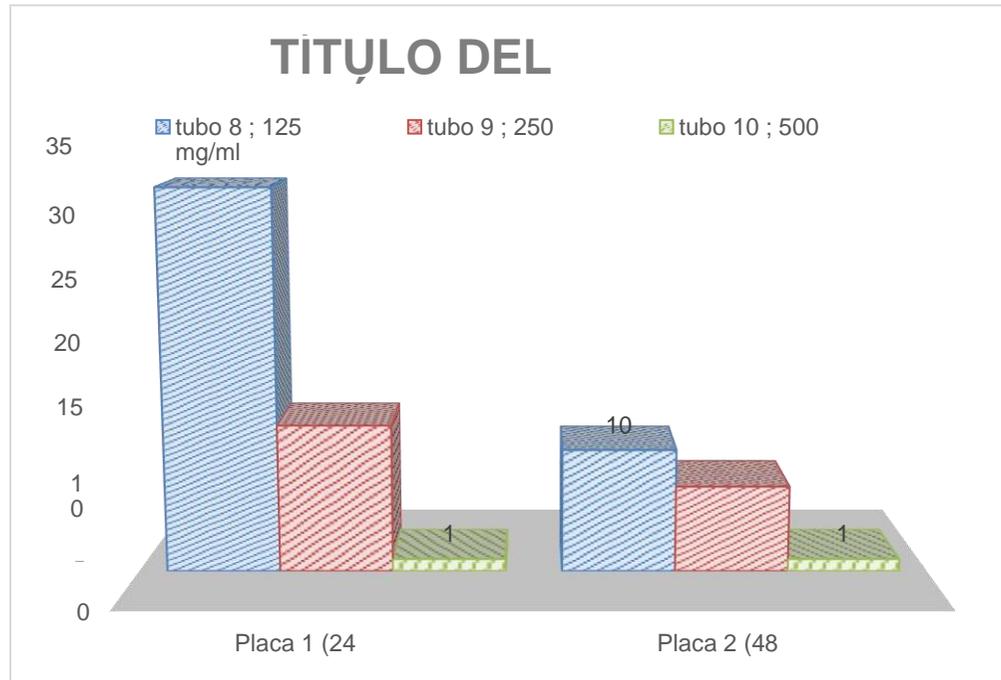
**FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.**

**FIGURA IV Gráficos de normalidad de los tratamientos a las 72 horas de aplicación de los tratamientos:**



FUENTE: Base de datos de ensayos de laboratorio.





Fuente: Tabla 19.

### Gráfico 0 1. Concentración mínima inhibitoria del Propóleo etanólico Serrano N° 1

RESULTO: CONCENTRACION DEL TUBO N° 10: 500mg/ ml fue la CMI.