

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

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

**“COMPARACIÓN DE LA MARCHA FITOQUÍMICA DE TRES
PROPÓLEOS PERUANOS, Y SU EFECTO ANTIBACTERIANO
FRENTE A CEPAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

AUTOR:

JAMES PIERRE SÁNCHEZ TORRES

ASESOR:

Mgtr. CÉSAR ABRAHAM VÁSQUEZ PLASENCIA

TRUJILLO-PERÚ

2018

TÍTULO DE LA TESIS

**“COMPARACIÓN DE LA MARCHA FITOQUÍMICA DE TRES
PROPÓLEOS PERUANOS, Y SU EFECTO ANTIBACTERIANO
FRENTE A CEPAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175”**

FIRMA DEL JURADO Y ASESOR

Dr. Elías Ernesto Aguirre Siancas

Presidente

Mgtr. Edwar Richard Morón Cabrera

Miembro

Mgtr. Juan Luis Pairazamán García

Miembro

Mgtr. César Abraham Vásquez Plasencia

Asesor

AGRADECIMIENTO

A Dios, nuestro señor, por ser mi
fortaleza en todo momento.

A mis padres por su apoyo incondicional
y paciencia, por apoyarme en la
formación de mi carrera e inculcar en mi
los valores que hoy en día tengo, por
mantenerme firme y constante mientras
cruzo mi camino hacia el éxito.

A mis hermanos por siempre estar
conmigo y darme las palabras de aliento
que muchas veces necesite, por no
dejarme rendir.

A mis asesores Mgtr. Pablo Millones
y Mgtr. Cesar Vásquez por su
orientación y apoyo para poder
realizar mi tesis, porque cada día me
enseñaron algo nuevo que enriquezca
este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres Hilario Sánchez y Teresa Torres por el esfuerzo que hacen día a día para darme una mejor educación con la finalidad de formar en mí una mejor persona, por depositar su confianza absoluta y no dudar nunca en que cumpliré mis metas.

A mis hermanos Humberto y Karen, porque siempre estuvieron a mi lado acompañándome en cada paso que he dado, porque siempre me alentaron en los momentos más difíciles.

A mi sobrino Thomas Sánchez quien es la alegría de mi vida.

A todos los docentes de odontología de la Universidad Católica Los Ángeles De Chimbote, quienes han contribuido en mi formación profesional.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su actividad antimicrobiana frente a cepas de *S. Mutans ATCC 25175*. Se tomó muestras de Arequipa, Huánuco y Huamachuco y fueron enmascarados por una persona ajena al estudio con las letras A, B y C; se llevaron al Laboratorio de Farmacia y Bioquímica para hacer los extractos en distintas concentraciones obtenidas a partir de la máxima solubilidad para ser enfrentadas con cepas de *S. mutans* mediante la técnica de pocillos para medir el halo de inhibición. Asimismo se realizó la marcha fitoquímica y conteo de polifenoles totales para todos los extractos. Los resultados de este estudio mostraron que el extracto con mayor efecto antimicrobiano es el recolectado en Arequipa al 10% con un halo de 18.5 mm seguido por el de 5% con un halo de 16.5 mm, al 2.5% con un halo de 14 mm, quien continuo fue el extracto de Huamachuco al 2% con un halo de 12 mm, seguido por el de 1% de 11 mm y 0.5% también de 11 mm; por último el extracto que mostró menor efecto fue el de Huánuco que al 2% logro formar un halo de 10 mm y las concentraciones al 1% y al 0.5% no mostraron halo sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa, resultados que coincidieron con la marcha fitoquímica y conteo de polifenoles con diferencia de medio gramo de Arequipa y Huamachuco sobre Huánuco.

Palabras clave: Propóleos, efecto antibacteriano, *S. mutans*, halo de inhibición.

ABSTRACT:

The objective of the study was to evaluate the phytochemical march of three Peruvian propolis and their antimicrobial activity against the strains of *S. Mutans* ATCC 25175. Samples were taken from Arequipa, Huánuco and Huamachuco and were masked by a person outside the study with the letters A, B and C; they were taken to the Pharmacy and Biochemistry Laboratory to make the drugs deal with strains of *S. mutans* using the well technique to measure the inhibition halo. The phytochemical march and counting of total polyphenols for all the extracts was also carried out. The results of this study show that the extract with the greatest antimicrobial effect is that collected in Arequipa at 10% with a halo of 18.5 mm followed by 5% with a halo of 16.5 mm, at 2.5% with a halo of 14 mm, who continuous was the extract of Huamachuco at 2% with a halo of 12 mm, followed by 1% of 11 mm and 0.5% also of 11 mm; Finally, the extract that showed the least effect was Huánuco, which at 2% managed to form a halo of 10 mm and the concentrations at 1% and 0.5% did not find halo, however the difference was not statistically significant, results that coincided with the phytochemical march and counting of polyphenols with difference of half a gram of Arequipa and Huamachuco on Huánuco.

Keywords: Propolis, antibacterial effect, *S. mutans*, inhibition halo.

Contenido

1. Título de la tesis	ii
2. Hoja de firma del jurado y asesor	iii
3. Hoja de agradecimiento y/o dedicatoria	iv
4. Resumen y abstract	vi
5. Contenido	viii
6. Índice de tablas	ix
I. Introducción	11
II. Revisión de literatura	13
III. Hipótesis	25
IV. Metodología	25
4.1 Diseño de la investigación	25
4.2 Población y muestra	25
4.3. Definición y Operacionalización de variables e indicadores	26
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de dato	28
4.5 Plan de análisis	52
4.6 Matriz de consistencia	53
4.7 Principios éticos	54
V. Resultados	55
5.1 Resultados	55
5.2 Análisis de resultados	61
VI. Conclusiones Aspectos complementarios	65
Referencias bibliográficas	67
Anexos	75

INDICE DE TABLAS

Tabla 01	Marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos	55
Tabla 02	Comparación del efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC-25175	56
Tabla 03	Comparación del efecto antibacteriano entre el propóleos de Arequipa, etanol y gluconato de clorhexidina al 0.12 %, frente a cepas de <i>Streptococcus Mutans</i> ATCC-25175	57
Tabla 04	Comparación del efecto antibacteriano entre el propóleos de Huánuco y gluconato de clorhexidina al 0.12 %, frente a cepas de <i>Streptococcus Mutans</i> ATCC-25175	58

Tabla 05	Comparación del efecto antibacteriano entre el propóleos de Huamachuco y gluconato de clorhexidina al 0.12 %, frente a cepas de Streptococcus Mutans ATCC-25175	59
Tabla 06	Correlación de polifenoles y el efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas de Streptococcus mutans-ATCC 25175.	60

I. INTRODUCCION

La cavidad oral es un vivero donde se puede encontrar diferentes tipos de microorganismos, quienes desempeñan un papel fundamental tanto en la salud y la enfermedad bucal si estos se asocian a condiciones ambientales y aumentan su número generan un desequilibrio, por lo actualmente se considera necesario buscar nuevos productos o sustancias que ayuden a controlar su proliferación.^{1,2}

Dos de las infecciones más prevalentes de la cavidad oral son la caries dental y la enfermedad periodontal, ambas ocasionadas por distintos microorganismos con distintas características; en la caries dental el primer colonizador es el *S. mutans* quien permite la adhesión a la superficie dental y la adhesión de los próximos microorganismos.³

En la actualidad existen diversos estudios que plantean alternativas de medicación para combatir a diferentes microorganismos que causan las principales enfermedades de la cavidad oral, siendo las más estudiadas las de origen vegetal como por ejemplo el propóleo, que es una sustancia gomosa-resinosa derivado de diversas plantas y árboles elaborado por abejas para sellar sus colmenas; al cual diversos estudios de investigación le atribuyen un sin número de beneficios y propiedades terapéuticas.^{4,5}

El propóleo se obtiene concretamente de las yemas y cortezas de la flora circundante a la colmena; ha sido utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades, cobrando importancia en investigación por sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, anticancerígenas y

antisépticas; dichas propiedades van a depender de la vegetación que la rodea, ubicación geográfica, clima, etc. Por otro lado sin duda la propiedad que mayor impacto ha tenido es el antimicrobiano que está directamente asociado a la concentración de flavonoides.^{6,7}

El objetivo del presente trabajo es comparar la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y evaluar su efecto antimicrobiano frente a cepas de *S. mutans*.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Antecedentes:

Ramírez et. Al.⁸ (2016) Realizaron el estudio “Efecto inhibitorio del extracto de propóleo sobre los microorganismos *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* que colonizan la cavidad oral en pacientes adultos de la clínica odontológica. UNA Puno -2016”, donde determinaron el efecto inhibitorio del extracto etanólico del propóleo a distintas concentraciones (25%, 50%, 75%,100%), sobre cultivos de cepas aisladas de *Streptococcus mutans* de pacientes con caries dental activa, para lo cual midieron el halo de inhibición. teniendo un diseño de estudio experimental, racional, de tipo prospectivo, transversal. Utilizando un tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia. Los resultados mostraron que el extracto al 100% era mayor obteniendo un halo de 14.25mm, al 75% 11.7mm, al 50% 10.5mm y al 25% 7.5 mm. Lo que les llevó a deducir que a mayor concentración mayor actividad inhibitoria frente a *S. mutans*.

Huayhua et. Al.⁹ (2009) Realizaron el estudio “Acción antimicrobiana del propolis de *Apis mellifera* L. y de *Salanum mammosum* L. (Teta de Vaca) contra microorganismos de la cavidad oral (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis*)” en el que comprobaron las propiedades antimicrobianas del propolis de *Apis mellifera* L. sobre cepas de *Streptococcus mutans* sembradas en medio Mueller-Hinton, donde aplicaron el propóleo de al 5 % y 10 %, asimismo como control se utilizó

amoxicilina. Los resultados se expresaron en mm obtenido de las medidas de los halos de inhibición; ahí se observó que el propóleo al 10% tiene un mejor efecto frente al *S. mutans* con un halo de 24 mm mientras que el propóleo al 5 % mostro un halo de 20mm y la amoxicilina de 21mm; por lo que concluyeron que es buena opción elaborar pastas dentales artesanales con propóleo al 10%.

Eguizábal et. al.¹⁰ (2007) Realizaron el estudio “Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*”. Determinaron la acción antibacteriana del extracto etanólico del propóleo peruano de Oxapampa al frente a cepas *Streptococcus mutans* midiendo los halos de inhibición formados con las distintas concentraciones de extractos, empleando como control la clorhexidina al 0,12 % y alcohol al 70 %. Los resultados mostraron mayor efecto inhibitorio contra *S. mutans* para todos los extractos de propóleos en comparación con los controles; dando 13,56 mm para el 0,8%; 12,00 mm el 20% y 12,33 para el 30 %, asimismo 11,72 para la clorhexidina y 9,61 para el alcohol respectivamente. Esto les permitió concluir que a menor concentración de propóleo hay un mayor efecto antimicrobiano.

Soto,¹¹ (2015) Realizaron el estudio “Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú”. Determinaron los metabolitos secundarios y cuantificó los fenoles y flavonoides totales de los extractos

etanólicos de propóleos recolectados de Piura, Ayacucho y Pucallpa, empleando reactivos de coloración y precipitación para a identificación de metabolitos según en método de Olga Lock y cuantificando los fenoles y flavonoides totales con el método de Folin-Ciocalteau y el de formación de complejos con $AlCl_3$ al 2 %. Los resultados mostraron la presencia de catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, fenoles y taninos en todos los extractos, asimismo la presencia de alcaloides solo en Piura, saponinas en Pucallpa y quinonas en Piura y Ayacucho concluyendo que debido a las diferencias significativas de región a región sustenta que existe la necesidad de estandarizar los tipos de propóleo en Perú.

Kumazawa et al.¹² (2003) Realizaron el estudio “Actividad antioxidante del propóleos de diversos orígenes geográficos” donde evaluaron las actividades antioxidantes del propóleo de distintos países como Argentina, Australia, Brasil, Bulgaria, Chile, China (Hebei, Hubei y Zhejiang), Hungría, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Tailandia, Ucrania, Uruguay y Estados Unidos y Uzbekistán para lo que prepararon extractos de etanol de propóleo y se realizó el conteo de polifenoles con espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta resolución y cada componente se analizó de forma cuantitativa. Los resultados obtenidos fueron en mayor cantidad para China (Hubei) con 299mg seguido por China (Hebei) con 298 mg, Australia con 269 mg, China (Zhejiang) con 262 mg, Estados Unidos con 256 mg, Ukraine con 255 mg, Hungary 242 mg, Nueva Zelanda con 237 mg,

Bulgaria con 220 mg, Argentina con 212 mg, Chile con 210 mg, Uruguay con 187 mg, Uzbekistan con 174 mg, Brasil con 120 mg, Sudáfrica con 99.5 mg y por ultimo Tailandia 31.2 mg.

2.2. Marco Teórico

2.2.1 MARCHA FITOQUIMICA

2.2.1.1 CONCEPTO

La marcha fitoquímica o “screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en el propóleo y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción del extracto con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles y reproducibles. Los resultados constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados.¹³

2.2.2 PROPÓLEO

2.2.2.1 CONCEPTO:

El propóleo una sustancia gomo-resinosa elaborada por las abejas de yemas y exudados de plantas, más la mezcla de la saliva de estas; el propóleo se ha empleado desde la antigüedad para tratar infecciones sobre todo respiratorias. . La palabra propóleo deriva del griego pro “defensa” y polis “comunidad o ciudad” que significa en defensa de la ciudad debido a que este producto es elaborado por las abejas con la finalidad de sellar las grietas

en sus panales para proteger a sus colmenas de posibles agentes.^{14, 15, 16.}

La estructura del propóleo varía pudiendo ser rígida a maleable según la temperatura en la que se encuentra; su color y tonalidad también varía debido según su composición química que a su vez depende de la flora circundante.^{17, 18, 19, 20.}

2.2.2.1 USO DEL PROPOLEO A TRAVES DEL TIEMPO:

El primer registro sobre el empleo del propóleo se encuentra en la época egipcia donde se usaba para embalsamar a los muertos y así conservarlos es decir se empleaba como un anti-putrefacto; en la cultura griega y romana se registra que el propóleo solía usarse como agente cicatrizante y antiséptico. Por otro lado en Perú los incas también usaron las propiedades del propóleo como un antipirético. En el siglo XVII el propóleo fue nombrado oficialmente como un medicamento por su alta efectividad antimicrobiana y fue comercializada en las farmacias de Londres^{21, 22.}

Ya por los años 1950 y 1960 en los países de Europa y la Unión Soviética empezaron a indicar para tratar enfermedades respiratorias como asma bronquial, rinitis crónica, faringitis, entre otras. De igual manera se empleó para tratar la tuberculosis en el transcurso de la segunda guerra mundial y en los Estados Unidos como un cicatrizante.^{22, 23, 24.}

2.2.2.2 RECOLECCION

• **CLIMA:** Es de suma importancia saber que la recolección de propóleos es muy influenciado por distintos factores siendo el clima uno de ellos ya que según la estación la flora se afecta en producción y funcionamiento y actividad biológica, debido a que influye en el cambio de la flora y la evolución de las especies de plantas e incluso se cree que produce cambios en la genética desde los cultivos hasta la maleza produciendo un cambio en la composición que como consecuencia afectaría su actividad biológica.^{25, 26, 27}

• **MÉTODOS DE RECOLECCIÓN:** La calidad del propóleo también se ve alterada por los métodos de recolección que puede ser el raspado con espátula metálica que si bien es cierto es la técnica más empleada actualmente ya existen estudios que han indicado que el contacto del propóleo con el metal podría alterar y contaminar sus componentes; es por ello que se han ido apostando por otras técnicas como las rejillas plásticas, raspado con espátula plástica, colector de propóleos inteligente, mallas Apifey y mallas tipo mosquitero^{28, 29}

2.2.2.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

FLAVONOIDES: Los flavonoides es el componente principal que se encuentra en los propóleos debidos a que es quien potencia su actividad biológica ya poseen grandes poseen un efecto antibacterianos, antivirales y antiinflamatorias. Además se encuentra en mayor concentración y en diversos tipos; se les

clasifica de acuerdo a su estructura química en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonol, chalconas, dihidrochalconas, isoflavonas, isodihydroflavones, flavanos, isoflavans y neoflavonoids.^{30, 31, 32, 33, 34, 35}

TERPENOIDES: Los terpenoides son también componentes esenciales ya que contribuyen a sus actividades antioxidantes y antimicrobianas; estos terpenoides se componen a su vez de acíclico, monocíclico, monoterpenos dicíclicos y sus derivados. Estos también logran conformar el 10% de los componentes que se encuentran en el propóleo, además es gracias a estos quienes le atribuyen el peculiar olor resinoso.³⁰

COMPUESTOS FENOLICOS: Están conformado por fenilpropanoides incluyendo el ácido cinámico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, el ácido ferúlico y sus derivados como el ácido cinámico preniladas quien es un compuesto químico sobresaliente debido a que atribuye a la actividad antimicrobiana del propóleo^{30, 36}

MINERALES: Según Shuai et. al. Estos se clasifican en:³⁰

a. NO TÓXICOS: Son aquellos minerales que se encuentran en propóleos y se sabe no producen ningún daño al organismo humano como: Ba, Ca, K Ni,, Mg, Na, Al, B, Mn, Cr, Sr, Zn y Fe.

b. TOXICOS: Así mismo el propóleos posee también

elementos tóxicos como: Arsénico, cadmio, mercurio y plomo.

2.2.2.4 ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

Los propóleos es tan popular por sus distintas actividades biológicas que posee estas están atribuidos a sus distintos componentes químicos como: ácidos fenólicos, ésteres de ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides, ácido cafeico, crisina, quercetina, galangina, apigenina, kaempferol, pinobanksina 5-metil éter, pinobanksina, pinocembrina y pinobanksina 3 – acetato quienes le dan una potente actividad antiviral, antifúngico, antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, inmunomodulador y antibacteriano ^{14, 15, 16, 36-39.}

- **ACTIVIDAD BACTERIANA:**

La actividad mayormente estudiada es la antimicrobiana ya que distintos propóleos han mostrado ser eficaces en bacterias Gram positivas y negativas. El primer registro o estudio de esta propiedad se remonta a 1948 por Kivalkina en 1948, y desde entonces se han estudiado en distintos microorganismos. ^{20, 40, 41}

Por otro lado en odontología se ha mostrado en diversos estudios su eficacia frente al *S. mutans* quien es la bacteria que coloniza en primera instancia para formar el biofilm cariológico; no solo han conseguido mostrar su alta capacidad de inhibición a la cepa bacteriana sino también inhibir a sus factores de virulencia (glucosiltransferasas) y así evitar su adhesión a la superficie dentaria y la adhesión de las próximas bacterias. ^{42, 43, 44.}

- **MECANISMO DE ACCION ANTIBACTERIANO:**

Actualmente no se tiene bien esclarecido su mecanismo de acción pero se especula que este genera una especie de sinergismo entre todos sus componentes principalmente los que se hallan en las resinas.^{45, 46.}

2.2.3 STREPTOCOCCUS MUTANS

2.2.3.1 **CONCEPTO:** *S. mutans* es una bacteria anaeróbica facultativa,

Gram positiva perteneciente a la flora microbiana habitual de la cavidad oral desde la erupción de la primera pieza dentaria; esta bacteria posee la necesidad de adherirse a un tejido duro, en este caso la pieza dentaria, que con ayuda de su producción de polímeros de glucano van a lograr una colonización eficiente y así formar junto a otras bacterias el biofilm cariologico que darán lugar a las lesiones cariosas; es por ello que se considera el principal agente causante de la caries dental, ya que es el primer colonizador y el que permite la adhesión de las siguientes bacterias, asimismo está vinculada directamente con enfermedades como endocarditis comprobándose su presencia en personas con esta enfermedad.^{47, 48, 49, 50, 51.}

2.2.3.2 **Morfología:** *S. mutans* posee una forma de bacilo cuando es aislada de la cavidad oral, pero cuando esta bacteria es cultivada adopta una forma de coco y empiezan a crecer en cadena. Su morfología va a variar según el pH del ambiente

al cual es sometido.^{47, 48}

Comúnmente *S. mutans* no suele producir hemólisis y pero si posee serotipos c, e, f y k, y posee la capacidad de fermentar glucosa, lactosa, manitol, etc. para convertirlo en ácido que como consecuencia tendrá la desmineralización del tejido dentario.^{47, 48.}

Serotipos: Estudios de investigación han mostrado que los serotipos de *S. mutans* puede ir variando en distintas personas o lugares del mundo por ejemplo en Norteamérica el serotipo predominante suele ser el serotipo c al igual que en Europa: mientras que en el norte de África es más predominante el serotipo b. Por otro lado se sabe también que según el serotipo es que el paciente presenta diversas formaciones de caries con distintas características.^{50, 51.}

Aquellos serotipos considerados como agentes cariogénicos suelen estar entre los serotipos c, e, y f de manera mayoritaria, y aquellos que se identifican en menor frecuencia son los *S. cricetus* (serotipo a), *S. rattus* (b), *S. sobrinus* (d y g), *S. macacae* (h), *S. downei* (h).^{50, 52}

2.2.3.3 **Factores de virulencia:** El desarrollo y propagación de *S. mutans* se debe a los factores de virulencia que posee y van a permitirle causar daño al tejido dentario como una consecuencia. Uno de los factores de virulencia de *S. mutans* es producción de

bacteriocinas mutacinas que van a ayudar a inhibir a otros microorganismos permitiendo que el *S. mutans* se establezca dentro de otros nichos ecológicos y permanezca de manera estable y así se desarrolle en mayor cantidad.^{49, 50, 51, 53.}

Además también posee la capacidad de producir exopolisacáridos solubles e insolubles a partir de sus enzimas fructosiltransferasas quienes producirán fructanos y glucosiltransferasas que producirán glucanos; tomando como base la sacarosa principalmente fructosa y glucosa. Estos le darán la particularidad de adherirse a la superficie dentaria y permitir la adhesión de otros microorganismos, así mismo va proveer la estructura al biofilm cariológico e incrementará su acidogenicidad.^{54, 55, 56}

III. HIPOTESIS:

Si existe diferencia entre la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su efectividad antimicrobiana frente a cepas de *S. mutans* Atcc 25175.

IV. METODOLOGÍA:

4.1 Diseño de la investigación:

Experimental, transversal y analítico.

4.2 Universo y población:

Población: La población fue constituida por cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

Muestra: La muestra fue tomada por conveniencia y fueron dos repeticiones por grupo. Por ello se utilizó diez placas inoculadas, con suspensión de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, divididas en cuatro grupos:

Primer grupo, extracto de Arequipa: 3 placas petri con *Streptococcus mutans* donde se colocó dos concentraciones al 10%, en otra dos concentraciones al 5% y en otra dos concentraciones al 2.5%.

Segundo grupo, extracto de Huánuco: 3 placas petri con *Streptococcus mutans* donde se colocó dos concentraciones al 2%, en otra dos concentraciones al 1% y en otra dos concentraciones al 0.5%.

Tercer grupo, extracto de Huamachuco: 3 placas petri con *Streptococcus mutans* donde se colocó dos concentraciones al 2%, en otra dos concentraciones al 1% y en otra dos concentraciones al 0.5%.

Cuarto grupo, control: 1 placa petri se colocó dos concentraciones de etanol al 96° y dos de gluconato de clorhexidina al 0.12%.

4.3 Definición y Operacionalización de variables

VARIABLES	DIMENSIONES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	VALORES Y CATEGORIAS	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN
Efecto Antibacteriano	Mayor o menor efecto antibacteriano	Capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento y/o desarrollo de bacterias sin dañar el organismo infectado.	Capacidad del extracto de propóleos de inhibir el crecimiento y/o desarrollo de bacterias sin dañar el organismo infectado.	Halo de Inhibición	mm	Cuantitativo	De razón
Marcha Fitoquímica	<ul style="list-style-type: none"> • Taninos • Fenoles • Leuciantocianidinas • Núcleo esteroides • Aminoácidos • Flavonoides • Esteroides • Quinonas • Cardenólidos • Alcaloides 	Determinación de la composición química y estructural del núcleo de un metabolito secundario vegetal	Metabolitos secundarios vegetales obtenidas a partir del extracto etanólico de los propóleos de Huamachuco, Arequipa y Huánuco.	Intensidad de la Presencia de los Componentes	Ausencia (-) Poca (+) Moderada (++) Alta (+++)	Cualitativo	Ordinal

VARIABLES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	VALORES Y CATEGORIAS	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO
Cuantificación de Polifenoles	Determinación de la concentración de polifenoles totales en el extracto.	Determinación de la concentración de polifenoles totales en el extracto etanólico de los propóleos de Huamachuco, Arequipa y Huánuco.	Cantidad de polifenoles en el extracto	Cuantitativo	Mg/g	De razón
Procedencia del Propóleo	Lugar donde se encuentra la granja apícola de donde se extrae el propóleos	Lugar donde se encuentra la granja apícola de donde se extrae el propóleos	Ubicación geográfica	Cualitativa	Huamachuco Arequipa Huánuco	Nominal

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica utilizada fue la observación microbiológica y el método fue microbiológico.

Para la evaluación se utilizó una ficha de recolección de datos (Ver anexo 01)

Para determinar la medida de los halos de inhibición, se utilizó la regla de precisión milimetrada Vogel con DIN/ISO 866/I.

Para la ejecución el personal capacitado firmó una constancia de asesoramiento al investigador (Ver anexo 02)

Para evidenciar la ejecución del proyecto se tomaron fotografías (Ver anexo 03)

4.4.1 De la obtención del Propóleo.

Al considerar que las abejas *Apis mellifera*, son más productivas cuando los apiarios se ubican a más de 1000 m de altitud, el propóleo fue obtenido directamente de los apicultores de Huamachuco, Huánuco y Arequipa. Las muestras se colocaron con una espátula de plástico directamente en recipientes de vidrio con tapa hermética, luego fueron cubiertas con bolsas oscuras de polietileno, selladas y enmascaradas. De inmediato fueron trasladadas al laboratorio de Fitoquímica de la facultad de Ciencias

de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, para su procesamiento.

4.4.2 De la obtención del extracto etanólico del propóleos.

Para la realización del extracto se siguió el protocolo de Tolosa⁵⁷ con algunas modificaciones:

Se trabajó con 10gr de propóleo en 100ml de etanol de 96° donde se observó una mezcla homogénea. Se desinfectaron, rotularon de la A-C y forraron los frascos con papel aluminio a continuación se pesaron en la balanza analítica 10 gr de cada propóleos, utilizando una espátula de acero inoxidable posteriormente se agregaron 100 ml de etanol a cada frasco; se taparon, agitaron y cubrieron con papel aluminio los 3 frascos para evitar el ingreso de luz. Los frascos con EEP fueron llevados al equipo de baño maría a 45°c por 60 minutos. Pasado se dejaron las muestras en baño maría para el proceso de maceración por 24 horas a temperatura ambiente.

Filtración al vacío en Caliente:

- Cumplido las 24 horas se calibro nuevamente el equipo de baño maría a 45°c y se esperó un tiempo de 5 minutos a que las muestras tomen esta temperatura.

Procedimiento:

- Se encendió la bomba de membrana al vacío.

- Agitación leve del frasco con la muestra.
- Se aplicó el proceso de filtración al vacío.
- Una vez terminado el proceso de filtración de cada muestra se procedió a colocar la tapa del matraz y se cubrió todo el frasco con papel de aluminio.
- Se almacenaron las muestras a 4°C hasta su uso en la obtención de las disoluciones.

4.4.3 De la determinación de las concentraciones del extracto etanólico de propóleo

Se sacaron todas las muestras de refrigeración y se dejaron que estas alcanzaran temperatura ambiente.

Se realizaron previos ensayos de solubilidad utilizando tubos de ensayo con diferentes cantidades equivalentes de EEP y cantidades equivalentes al etanol en 100 ml. Con la finalidad de conocer en qué porcentaje se encuentra la máxima solubilidad del EEP.

A partir de encontrar la máxima concentración de cada muestra se obtuvieron 2 disoluciones más que fueron colocadas en frascos ámbar (desinfectados y rotulados de las letras A-C) y llevados a almacén a refrigeración de 4°C . Se obtuvo la máxima, intermedia y mínima concentración de cada muestra.

4.4.4 Método para la Marcha Fitoquímica del propóleo

Para la realización de la marcha fitoquímica se siguió el protocolo brindado por Hinojosa et al. ⁵⁸ con algunas modificaciones:

Se lavaron, desinfectaron, forraron con papel aluminio y rotularon con nombre, 5 balones para cada muestra. Se procedió a pesar la muestra seca de cada propóleo 10 g en la balanza analítica con ayuda de espátula de acero inoxidable y llevado a cada balón. Se agregó a cada balón 100 ml de etanol.

Previamente a la maceración se agito levemente cada balón. Se dejó macerar por 20 horas a temperatura ambiente.

REFLUJO: Pasado las 20 horas se procedió a realizar el reflujo, el objetivo de hacer este procedimiento es evitar perder el disolvente (etanol).

Se colocaron las 3 muestras a calentamiento a una temperatura entre 60° a 80° por 4 horas. Pasado las 4 horas de reflujo se procedió a la eliminación del solvente a través del rotavapor.

Separación de 4ml fracción “A”

Antes de llevarse cada matraz con el extracto metanólico al rotavapor se extrajo con una pipeta 4 ml de la muestra y se colocó en un frasco ámbar (desinfectado y rotulado previamente). Así se obtuvo la fracción “A”.

Reactivos:

R. Gelatina:

De manera ordenada se ubicaron los 3 frascos de la fracción “A”, con una punta de micropipeta para cada uno. En las placas excavadas de laboratorio y se agregaron: 1ml de cada muestra de la fracción “A” en cada pocillo. 3 gotas de reactivo gelatina a cada muestra. Se observó la reacción para luego interpretar cada una.

Para las pruebas con R. de gelatina y R. de cloruro férrico en ambos casos se considera positiva la aparición de un precipitado.

Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

R. Cloruro Ferrico:

La prueba del cloruro férrico es utilizada para determinar la presencia o ausencia de fenoles en una muestra dada⁵⁸.

En las placas excavadas de laboratorio y se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción “A” en cada pocillo.
- 1 gota del reactivo de cloruro férrico al **0.1** % a cada pocillos.
- Se observó la reacción para luego interpretar cada una.
- Para esta prueba se considera positiva la aparición de un precipitado, donde puede formarse un complejo coloreado

transitorio o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) que permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, determina tanto fenoles como taninos. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

Reactivo Ninhidrina: Para aminoácidos

Esta reacción es bastante importante, pues es universalmente empleada para detectar cualitativamente y cuantitativamente a los aminoácidos. La Ninhidrina es un agente oxidante de los grupos alfa-amino, liberando amoníaco, CO₂ y el correspondiente aldehído, así como la forma reducida de la Ninhidrina⁵⁸.

En las placas excavadas de laboratorio, se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción "A".
- 3 gotas del reactivo ninhidrina a cada muestra.
- Se observó la reacción para luego interpretar cada una.
- La aparición de un color violáceo o amarillo y precipitado determina como positiva a una prueba. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

R. Shinoda: Para Flavonoides

En las placas excavadas de laboratorio se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción "A".
- Limaduras de magnesio a cada muestra de la A-C.
- Se agregaron 2 gotas de HCL.

- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
- El desarrollo inmediato de la coloración es indicativo de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

Secado con rotavapor

El rotavapor es un equipo de destilación rotatorio asociado a un baño maría que es usado principalmente en laboratorios de síntesis químicas, investigaciones en bioquímica y análisis químico cualitativo y cuantitativo de extractos de naturaleza orgánica e inorgánica. En este caso se utilizó para separar por medio de evaporación a presión reducida y suave, el solvente etanol del soluto propoleo⁵⁸.

El extracto metanólico fue colocado en el balón de evaporación semi-sumergido en agua destilada.

Se calibro el baño maría a 60°C y el sistema de rotación del matraz de evaporación empezó a girar. Se redujo la presión atmosférica mediante la aplicación de una bomba de vacío permitiendo que los solventes sean separados del soluto y destilados en el tubo de

condensación a baja temperatura (agua helada) y recolectados en el balón colector.

Extraer con ácido clorhídrico

Una vez que se obtuvo el soluto en el matraz de evaporación, se agregaron con la pipeta 30 ml de HCL al 1% a 50° C en baño maría hasta que se éste se disolviera.

Filtracion

En la muestra B se utilizó la filtración por gravedad, esta que se realiza a través de un embudo de vidrio provisto de un filtro de papel cónico, donde el líquido pasa a través de ellos por efecto de la gravedad, quedando la parte sólida retenida en el filtro. Las demás muestras pasaron por filtración al vacío que es más rápida que la filtración por gravedad para lo que se utilizó los siguientes instrumentos:

- Embudo decantación.
- Embudo
- Papel filtro
- Pinzas
- Equipo al vacío.
- Dispositivo para unir embudo y equipo al vacío.

Del proceso de filtración se obtuvo la solución acida q se quedó en el embudo decantación y la parte insoluble en el balón.

FASE INSOLUBLE- FRACCION B

El precipitado es la sustancia sólida visible que obtuvo con el método de filtración (parte que quedo en el papel filtro y que luego se colocó en el balón)⁵⁸.

- El objetivo de lavar el precipitado es eliminar moléculas del líquido filtrado puesto que algo de este puede haberse quedado adherido al precipitado.

- Los precipitados se deben lavar con sustancias que no los disuelvan, en este caso lavamos con agua destilada en pequeños volúmenes, se agitó levemente y se llevó a filtración por gravedad; esta operación se realizó tres veces.

- Después de lavar la parte insoluble se agregaron 10 ml de triclorometano.

- Se calentó en baño maría, se llevó a filtración por gravedad y fue secado con sulfato de sodio; éste que fue agregado en el papel filtro. La parte filtrada de cada muestra se guardó en frascos ámbar (3 frascos) lavados desinfectados y rotulados previamente.

Así se obtuvo la fracción B.

REACTIVOS:

R. Lieberman buchar: Para esteroides

Anhídrido acético + Ácido sulfúrico:

- Se llevaron las muestras A-C a baño maría para obtener un estado líquido, porque estas estaban condensadas.

En los tubos de ensayo de laboratorio (previamente lavados y rotulados a de la A-C), se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción "B".
- 2 a 3 gotas de anhídrido acético en cada tubo de ensayo.
- 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico a cada muestra.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
- Si hay formación de colores azul o verde que cambian con el tiempo indica presencia del núcleo esteroide. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

Reacción borntrager: Para quinonas

NaOH al 10% diluido en agua destilada.

En tubos de ensayo (previamente lavados y rotulados) se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción "B" en cada tubo.
- 2 gotas de NaOH al 10% (hidróxido de sodio)
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.

- El cambio de coloración nos indicó la presencia de compuestos quinónicos al utilizar el NaOH al 10 %.Indica positivo cuando hay presencia de una fase acuosa roja o amarilla con fluorescencia roja.
- Se observó la formación de una coloración rosada a roja, indicándonos la presencia de antraquinonas. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

Solución acida:

Es la parte líquida que obtuvimos con la filtración en el embudo de decantación, hubo que esperar a que enfriara por que se encontraba tibia.

Alcalinizar: Una solución alcalina es aquella que al medir su pH, éste sea superior a 7, ya que el 7 es la neutralidad y pH inferiores a él son ácidos⁵⁸.

En este caso para alcalinizar se utilizó amoníaco (desde 1ml) y con las tiras indicadoras de pH se fue comprobado en qué nivel se encontraba (observando los colores en el indicador). Se determinó que con 3ml de amoníaco la solución estaba alcalina con un pH 9 según el indicador (esta cantidad se agregó a todas las soluciones de A-C).

Extracción: Es un procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no

miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interface⁵⁸.

En el laboratorio el proceso se desarrolló de siguiente manera:

- Embudo de decantación con la sustancia (solución acida) a temperatura ambiente con pH alcalino con disolvente 1.
- Se agregó el disolvente 2 triclorometano en 25ml en el que se extraerá y en el que la solubilidad de la sustancia es mayor.
- Se tapó el embudo y se agito vigorosamente para formar una emulsión de los dos líquidos inmiscibles y permitir el reparto de la sustancia entre ambos.
- Se abrió la válvula del embudo después de agitar para que los gases que se puedan haber formado puedan salir del embudo.
- Se dejó decantar por 14 horas para que se forme una interface clara entre ambos. Fase superior (*Fase acuosa*), fase inferior (*fase clorofórmica*).

FASE CLOROFORMICA: FRACCION C

- Pasado las 14 horas se abrió la espita inferior del embudo y se dejó caer el líquido más denso (fase clorofórmica) en un embudo de decantación.
- Fase clorofórmica: en la filtración con solo papel filtro pueden pasar moléculas de la fase acuosa en el cloroformo y

alterar los resultados, por esta razón para asegurarnos de que no ingrese ninguna molécula, se hace el lavado que consiste en agregar 10ml de agua destilada, agitar con el fin de que ésta arrastre las moléculas que puedan encontrarse, unirse y llevarlas a la fase acuosa, formándose así nuevamente dos fases.

- Se dejó decantar por 30 minutos.

SECADO: Se abrió la espita inferior del embudo de decantación y se dejó caer el líquido más denso (fase clorofórmica) en el frasco ámbar (lavado, desinfectado y rotulado previamente) que estaba listo con el embudo que contenía el papel filtro y el sulfato de sodio.

- A la fase clorofórmica que fue secada con sulfato de sodio, se agregaron 50ml de triclorometano; es así como obtuvimos la FRACCION “C”. Este procedimiento se realizó a las 3 muestras.
- La fase acuosa (agua con la que lavamos el cloroformo) que quedo en el segundo embudo de decantación se llevó al primer embudo que contiene la fase acuosa.

REACTIVOS:

En el esquema de marcha fotoquímica se cambió el reactivo KEDDE por BALJET.

REACTIVO BALGET: PARA CARDENÓLIDOS

Acido pícrico al 1% en etanol 20ml + NaOH AL 10% (hidróxido de calcio):

Se usaron tubos de ensayo previamente lavados y rotulados de la A-C y se agregaron:

- 2ml de cada muestra de la fracción “C”.
- 0.2 ml de triclorometano a cada tubo.
- Se llevaron todos los tubos en la gradilla a baño maría para la evaporación de la muestra.

En las placas excavadas de laboratorio se agregaron en cada pocillo:

- 2 o 3 gotas de muestra de cada tubo.
- 3 a 4 gotas de la solución de ácido pícrico al 1.
- 3 a 4 gotas de NaOH al 10%.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.

El cambio de coloración nos indicó la presencia de cardenólidos. Se observó la formación de una coloración amarillo a rojo oscuro, indicándonos la presencia cardenólidos. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

REACTIVO DE LIEBERMAN BURCHARD

Anhídrido acético +Ácido sulfúrico+Triclorometano

En tubos de ensayo previamente lavados y rotulados a de la A-F se agregaron:

- 2ml de la fracción “C”.
- 0.2ml de triclorometano.
- Se llevaron los tubos en una gradilla a baño maría para la evaporación de la muestra.
- Se añadieron de 3 a 4 gotas de anhídrido y 3 a 4 gotas de ácido sulfúrico a cada tubo de ensayo.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.

Si hay formación de colores azul, verde que cambian con el tiempo indica presencia del núcleo esteroide. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto

REACTIVO DRANGENDORFF: PARA ALCALOIDES

- Se trabajó en tubos de ensayo previamente lavados y rotulados a de la A-F.
- Se añadieron 2ml de cada muestra de la fracción “C”.
- Se secaron las muestras por evaporación en baño maría.
- Después de secar las muestras se agregaron 2 ml de HCL al 1% a cada tubo.
- En placas escavadas de laboratorio se filtraron 3 gotas de cada muestra en cada posillo de la placa.

- Se agregaron de 3 a 4 gotas del reactivo Drangendorff a cada muestra.
 - Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
 - Da positivo si se forma un precipitado pardo anaranjado.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

FASE ACUOSA:

- **La saturación** es el punto en que una solución de una sustancia no puede disolver más de dicha sustancia, y que cantidades adicionales aparecerán como un precipitado. Este punto de máxima concentración es el punto de saturación⁵⁸.
- A la fase acuosa que quedó retenida en el primer embudo de decantación se saturó con una solución de sulfato de sodio y sal anhidra.
- **EXTRAER:** Se hizo una mezcla con triclorometano más etanol y se agregó a la fase acuosa, se agitó y se dejó decantar. Como resultado se obtuvieron dos fases: *fase cloroformico-etanólica (fase inferior)* y la *fase acuosa remanente*.

FASE CLOROFORMICA-ETANOLICA: FRACCION “D”

- Se abrió la espita inferior del embudo y se dejó escurrir el líquido más denso fase cloroformica-etanólico en un embudo de decantación. La fase acuosa se deja en el embudo de origen.

- A la fase clorofórmica-etanolica se agregó 10ml de solución de sulfato sódico para el lavado, en el que se agitó con el fin de que éste arrastrara las moléculas que se encontraran, unir las y llevarlas a la fase acuosa, formándose así nuevamente dos fases.
- Se dejó decantar hasta que se formen bien las dos fases.

SECADO Y FILTRACION: Se abrió la espita inferior del embudo de decantación que estaba sostenido por una pinza por encima del embudo con papel filtro con sulfato de sodio (para retener moléculas de la fase acuosa), éste que estaba dentro del frasco ámbar (lavado, desinfectado y rotulado previamente) y se dejó filtrar el líquido más denso fase clorofórmica-etanolica en el frasco ámbar. Así obtuvimos la fracción “D”. Este procedimiento se realizó a las 3 muestras.

REACTIVOS PARA FRACCION “D”

- En 6 tubos de ensayo se agregaron 1ml de cada muestra + 2.5 ml de etanol.
- Se llevaron a baño maría a evaporación a sequedad.
- Después de haberse secado por completo se agregaron a todos los tubos 2.5 ml de etanol.
- Este procedimiento se aplicó para cada reactivo de esta fracción.

REACTIVO SHINODA: PARA FLAVONOIDES

- En las placas escavadas de laboratorio, se agregaron 1ml de cada muestra de la fracción “D” que se encontraban con etanol.
- Se añadieron partículas de magnesio a cada muestra de la A-C.
- Se agregaron con la micropipeta de 3 a 4 gotas de HCL.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada muestra.
- El desarrollo inmediato de la coloración es indicativo de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

REACTIVO DE ROSENHEIM: PARA LEUCANTOCIANIDINAS

- A los 6 tubos de ensayo con 1ml de muestra de la fracción D, previamente secados a vapor en baño maría y agregados 2.5ml de etanol.
- Se agregaron 3 a 4 gotas del reactivo Rosenheim.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada muestra.

- El desarrollo inmediato de la coloración rosado o rojo carmesí es indicativo de la presencia de leucantocianidinas. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

REACTIVO BALGET: PARA CARDENOLIDOS

Acido pícrico al 1% en etanol 20ml + NaOH AL 10% (hidróxido de calcio).

- 6 tubos de ensayo con 1ml de muestra de la fracción D, previamente secados a vapor en baño maría y agregados 2.5ml de etanol.
- En las placas escavadas de laboratorio se agregaron 1 ml de muestra en cada pocillo.
- Se añadieron de 3 a 4 gotas de la solución de ácido pícrico al 1% y de 3 a 4 gotas de NaOH al 10% en cada pocillo.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
- El cambio de coloración nos indicó la presencia de cardenolidos.
- Se observó la formación de una coloración amarillo a rojo oscuro, indicándonos la presencia cardenolidos. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

REACTIVO DE LIEBERMAN BURCHARD

Anhídrido acético + Ácido sulfúrico

- A los 6 tubos de ensayo con 1ml de muestra de la fracción D, previamente secados a vapor en baño maría y agregados 2.5ml de etanol.

Se agregaron cada tubo de ensayo:

- 1 ml de triclorometano.
- 3 o 4 gotas de anhídrido acético
- 3 a 4 gotas de ácido sulfúrico.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
- Si hay formación de colores azul, verde que cambian con el tiempo indica presencia del núcleo esteroide. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

REACTIVO DRANGENDORFF: PARA ALCALOIDES

- A los 6 tubos de ensayo con 1ml de muestra de la fracción D, previamente secados a vapor en baño maría y agregados 2.5ml de etanol.

Se añadieron a cada tubo de ensayo:

- 2 ml de HCL al 1%
- 1ml de triclorometano.
- 3 o 4 gotas de HCL al 1%.
- 3 a 4 gotas del reactivo Drangendorff.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.

- Da positivo si se forma un precipitado pardo anaranjado.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

FRACCION “E”

La fase acuosa (fase líquida de sulfato sódico con la que lavamos el cloroformico-etanolico) que quedo en el segundo embudo de decantación se llevó al primer embudo que tiene la fase acuosa remanente. Ésta vendría a ser la FRACCION “E”.

REACTIVO ROSENHEIM: LEUCANTOCIANIDINAS

En las placas excavadoras de laboratorio, se agregaron:

- 1ml aprox. de cada muestra de la fracción “E”.
- 3 a 4 gotas del reactivo Rosenheim.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada muestra.
- El desarrollo inmediato de la coloración rojo carmesí es indicativo de la presencia de leucantocianidinas.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

REACTIVO SHINODA: PARA FLAVONOIDES

En las placas de toque de porcelana de laboratorio, se agregaron:

- 1ml aprox. de cada muestra de la fracción “E”.
- Partículas de magnesio.
- Con la micropipeta de 3 a 4 gotas de HCL.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada muestra.
- El desarrollo inmediato de la coloración es indicativo de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración. Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto.

Determinación de polifenoles totales

Se realizó según el método de Folin Ciocalteu, mediante el empleo de un espectrofotómetro UV- Vis, En un tubo de reacción se adicionaron 50 µl de solución etanólica de propóleo, 2.5ml de agua y 500 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck). Se agito y luego se dejó en reposo por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 2ml de Na₂CO₃ al 10%. Después de 1 hora en la oscuridad se observó la absorbancia a 760 nm usando la curva de calibración el estándar de catequina el cual permitió obtener la concentración de polifenoles totales expresado en miligramos de polifenoles totales por gramos de propóleo. Este procedimiento se desarrolló con cada uno de los propóleos por triplicado.

Se eligieron las soluciones etanólicas de propóleos de cada muestra según su concentración máxima, intermedio y mínima.

4.4.5 De la obtención de *Streptococcus mutans*

Las cepas fueron obtenidas directamente de la ATCC y se activaron de la siguiente manera

S. mutans:

1. Se abrió el Vial ATCC según instrucciones, se reconstituye la cepa liofilizada con 3 ml de BHI.
2. Se realizó el sembrado en 4 tubos conteniendo c/u 6 mililitros de BHI a cuales se les colocara 0.5 ml aproximadamente de medio BHI conteniendo la cepa y se coloca en la estufa a 37° C en condiciones micro aeróbicas sellándose la parte superior con para film por 24 horas.
3. Por último se sembró en 1 tubo conteniendo 6 ml de thioglicolato al cual se colocó 0.5 ml aproximadamente de medio BHI conteniendo la cepa y se coloca en la estufa a 37° C en condiciones micro aeróbicas por 24 horas.

4.4.6 Del enfrentamiento microbiológico.

S. Mutans

1. Previamente se incubó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a 37°C por 24 horas en dos tubos de BHI conteniendo 6 mililitros cada uno.
2. Se preparó tres frascos de BHA con 250 ml c/u para el enfrentamiento, un día anterior el cual se diluyó a baño maría.
3. Los dos tubos que se sembraron anteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 8 minutos, posteriormente se decantó y se reconstituyó el pellet con caldo BHI hasta obtener una densidad óptica de 0.270.
4. Luego se pasó 4ml de esta dilución a un tubo conteniendo 40 ml de BHI, se homogenizó y se colocó; a partir de este se preparó 1 ml en 10 placas a las cuales posteriormente se le adicionó 25 ml de BHA licuado, se homogenizó.
5. Se dejó solidificar el agar y se pasó a realizar los pozos con un sacabocado de 6 mm, y en dichos pozos se agregó 100 µl de cada propóleo, la prueba se hizo por duplicado. Se consideró también etanol de 96° como control negativo y como control positivo clorhexidina de 0.12%.
6. Se dejó a incubar por 24 horas a 37°C en microanaerofilia.

4.4.7 Del análisis del resultado

Se comparó los tres extractos de propóleos, donde se evaluó, cual muestra un mayor halo de inhibición.

4.5 Plan de Análisis

- Los datos experimentales fueron procesados en Minitab 17 y presentados en tablas con medias y desviaciones estándar.
- La marcha fitoquímica de los propóleos procedentes de Arequipa, Huánuco y Huamachuco fueron comparados descriptivamente. En cambio, el halo de inhibición y los polifenoles de los tres propóleos fueron comparados empleando el ANOVA y la prueba de Duncan. Asimismo, el efecto antibacteriano fue sometido a evaluación frente al etanol y la clorhexidina, empleando en cada caso el ANVA y el test de Dunnett.
- La significancia fue considerada al 5%.
- La correlación entre los polifenoles del propóleo y los halos de inhibición fue determinada empleando el coeficiente de correlación de Pearson y el test T de Student para coeficientes de correlación.

4.6 Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Metodología	Población
<p>¿Existe diferencia entre la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su efecto antibacteriano frente a cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175?</p>	<p>Objetivo general:</p> <p>Comparar la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su efecto antibacteriano frente a cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Comparar el efecto antibacteriano de las concentraciones del propóleo obtenido en la ciudad de Arequipa sobre cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175. • Comparar el efecto antibacteriano de las concentraciones del propóleo obtenido en la ciudad de Huánuco sobre cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175. • Comparar el efecto antibacteriano de las concentraciones del propóleo obtenido en la ciudad de Huamachuco sobre cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175. • Correlacionar la concentración de polifenoles con el efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175. 	<p>Si existe diferencia entre la caracterización fitoquímica de tres propóleos peruanos y su actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>S. mutans</i> ATCC 25175.</p>	<p>Tipo de investigación</p> <p>Es una investigación de tipo cuantitativo.</p> <p>Nivel de investigación</p> <p>Es una investigación de nivel explicativo.</p> <p>Diseño de la investigación</p> <p>Experimental, transversal y analítico.</p>	<p>La población fue constituida por colonias de <i>S. mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Muestra:</p> <p>La muestra fue tomada por conveniencia y fueron dos repeticiones por grupo.</p>

PRINCIPIOS ÉTICOS

El material utilizado fue llevado a la autoclave antes de desecharlo, puesto que así evitaremos contaminar el medio ambiente donde se realizó la ejecución del proyecto.

V. RESULTADOS

5.1 Resultados

Tabla 1
Marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos

Fracción	Metabolitos	Ensayos	Arequipa	Huánuco	Huamachuco
A	Taninos	Gelatina	+++	+++	+++
	Fenoles	Cloruro férrico	+++	+++	+++
	Aminoácidos	Nihidrina	+++	+++	+++
	Flavonoides	Shinoda	+++	+++	+++
B	Esteroides	Lieberman-Buchard	+++	+++	+++
	Quinonas	Borntranger	++	-	+++
C	Cardenolitos	Bergelt	++	+	+++
	Núcleo esteroides	Lieberman-Buchard	++	+++	+++
	Acaloides	Drangendorff	+++	++	++
D	Flavonoides	Shinoda	++	-	+
	Leuciantocianidinas	Rosenheim	-	-	++
	Núcleo esteroides	Lieberman-Buchard	-	-	-
E	Leuciantocianidinas	Rosenheim	-	-	-
	Flavonoides	Shinoda	++	-	+
Ausencia (-)		Poca (+)	Moderada (++)	Alta (+++)	

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

En la fracción A, los propóleos de Arequipa, Huánuco y Huamachuco presentaron alta presencia de taninos, fenoles, aminoácidos y flavonoides. En la fracción B, los 3 propóleos presentaron alta presencia de esteroides, el propóleos de Huánuco no presento quinonas mientras que el de Huamachuco y Arequipa presentaron alta y moderada presencia respectivamente. En la fracción C, el propóleo de Huamachuco presento más cardenolitos. En las fracciones D y E el propóleo de Arequipa presento mayor cantidad de flavonoides.

Tabla 2

Comparación del efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos frente a cepas de

Streptococcus mutans ATCC 25175

	AREQUIPA			HUANUCO			HUAMACHUCO		
	10%	5%	2.5%	2%	1%	0.5%	2%	1%	0.5%
Media – Halo (mm)	18.5	16.5	14.0	10.0	0.0	0.0	12.0	11.0	11.0
DE	0.7	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
ANOVA: F	754.875								
P	0.000								
Duncan	g	f	e	b	a	a	d	c	c

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

Se encontró diferencia estadística (P=000) entre los halos de inhibición de los 3 propóleos.

Tabla 3

Comparación del efecto antibacteriano entre el propóleos de Arequipa, etanol y gluconato de clorhexidina al 0.12 %, frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175

	AREQUIPA			Etanol	Gluconato de clorhexidina al 0.12%
	10%	5%	2.50%		
Media - Halo (mm)	18.5	16.5	14	0.0	29.5
DE	0.7	0.7	0.0	0.0	0.7
ANOVA:F				560.67	249.22
P				0.000	0.000
Dunnett					
Etanol	a	a	a	b	
Clorhexidina	b	b	b		a

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

El extracto de Arequipa al 10% presento mayor efecto antibacteriano (18.5 mm), sin embargo su efecto estadísticamente (P=0.00) fue menor al de la clorhexidina (29.5 mm)

Tabla 4

Comparación del efecto antibacteriano entre el propóleos de Huánuco y gluconato de clorhexidina al 0.12 %, frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175

	HUÁNUCO			Gluconato de clorhexidina al 0.12%
	2%	1%	0.50%	
Media – Halo (mm)	10.0	0.0	0.0	29.5
DE	0.0	0.0	0.0	0.7
ANOVA:F				3094.33
P				0.000
Dunnett				
Clorhexidina	b	b	b	a

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

El extracto de Huánuco al 2% presentó el menor efecto antibacteriano (10.0 mm), sin embargo su efecto estadísticamente ($P=0.00$) fue menor al de la clorhexidina (29.5 mm).

Tabla 5

Comparación del efecto antibacteriano del propóleos de Huamachuco y gluconato de clorhexidina al 0.12 %, frente a cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175

	HUAMACHUCO			Gluconato de clorhexidina al
	2%	1%	0.50%	0.12%
Media – Halo (mm)	10.0	11.0	11.0	29.5
DE	0.0	0.0	0.0	0.7
ANOVA:F				1323.67
P				0.000
Dunnett				
Clorhexidina	b	b	b	a

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

El extracto de Huamachuco al 2% presento el mayor efecto antibacteriano (12.0 mm), sin embargo su efecto estadísticamente (P=0.00) fue menor al de la clorhexidina (29.5 mm).

Tabla 6

Correlación de polifenoles y el efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas de Streptococcus mutans ATCC 25175.

Propóleo	Concentración	Polifenoles (mg)	Halo (mm)
Arequipa	10%	1.02	18.5
	5%	1.00	16.5
	2.5	1.00	14
Huánuco	2%	0.48	10
	1%	0.42	0
	0.5%	0.39	0
Huamachuco	2%	1.06	12
	1%	1.05	11
	0.5%	1.03	11
	r=	0.757	
	t=	3.065	
	p=	0.018	

Fuente: Datos proporcionados por el investigador.

Se encontró diferencia estadística entre la concentración de polifenoles de los 3 propóleos (P= 0.018). Los halos de Arequipa y Huamachuco presentaron mayor concentración de polifenoles 1.02 y 1.06 respectivamente; y mayor efecto antibacteriano frente al de Huánuco que presento menor concentración de polifenoles 0.48.

5.2 Análisis de resultados

Los resultados de este estudio muestran que el extracto con mayor efecto antimicrobiano es el recolectado en Arequipa al 10% con un halo de 18.5 mm seguido por el de 5% con un halo de 16.5 mm, al 2.5% con un halo de 14 mm, quien continuo fue el extracto de Huamachuco al 2% con un halo de 12 mm, seguido por el de 1% de 11 mm y 0.5% también de 11 mm; por último el extracto que mostró menor efecto fue el de Huánuco que al 2% logro formar un halo de 10 mm y las concentraciones al 1% y al 0.5% no mostraron halo sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa. Estos resultados reflejan que la concentración influye en el efecto ya que el extracto de Arequipa tenía las mayores concentraciones sobre Huamachuco y Huánuco esto confirma los resultados de Huayhua et al.⁹ quien compararon los extractos de propóleos al 5% y 10% donde el extracto al 10% mostro un mejor resultado con un halo de 24 mm a comparación del extracto al 5% con un halo al 20mm al igual que Ramírez et. al.⁸ quien estudio los extractos de propóleo al 25%, 50%, 75% y 100% y fue el extracto al 100% quien obtuvo el mayor halo con 14.25 mm, 75% con 11.7 mm, 50% con 10.5 mm, y en último lugar al 25% con un halo de 7.5 mm.

Sin embargo al tomar los resultados de Huamachuco y Huánuco que obtenían las mismas concentraciones al 2%, 1% y 0.5% se observó una diferencia ya que Huamachuco se elevó en los resultados logrando formar al 2% un halo de 12mm mientras que Huánuco al 2 % consiguió un halo de 10mm, y si se sigue analizando hubo mayor discrepancia en el halo que formo el extracto de Huamachuco al 1% y

0.5% siendo de 11 mm mientras que el extracto de Huánuco al 1% y 0.5% no formó halo de inhibición, lo que indica que el lugar de origen también influye en la actividad antibacteriana del propóleo ya que Eguizábal et. al. ¹⁰ estudió el extracto de propóleo de Oxapampa en concentraciones de 0.8%, 20% y 30% y obtuvo resultados opuestos a lo de los autores anteriores ya que en sus resultados se observó que a menor concentración existía un mayor efecto ya que 0.8% logro un halo de 13,56 mm, al 20% un halo de 12mm y el de 30% un halo de 12.3 mm.

Por otro lado en la evaluación de los metabolitos se confirmó la presencia de taninos, fenoles, aminoácidos, flavonoides, esteroides en alta intensidad para los tres extractos demostró; la presencia de quinonas fue solo en los extractos de Arequipa y Huamachuco siendo el del ultimo en mayor intensidad, la presencia de cardenolicos fue para los tres extractos pero en mayor intensidad para Huamachuco, seguido por Arequipa y en menor concentración en Huánuco; los núcleo esteroides también estuvieron presentes en los tres extractos pero en una alta concentración en los extractos de Huánuco y Huamachuco asimismo Arequipa con los alcaloides; por su parte leuciantocianidinas estuvo presente solo en el extracto de Huamachuco demostrando así que la cantidad de metabolitos y la presencia de los mismos dependen del lugar de origen coincidiendo con lo mostrado por Soto¹¹ que en su estudio para determinar los metabolitos de extractos etanólicos de tres propóleos peruanos de distintos lugares: Piura, Ayacucho y Pucallpa mostró que la presencia de Antocianidina, triterpenos y esteroides, catequinas, lactonas, en la misma intensidad para los tres extractos: Piura, Ayacucho y Pucallpa; asimismo la presencia de fenoles,

taninos y flavonoides estuvieron presentes en los tres extractos estaban en mayor intensidad para Ayacucho, seguido por Piura y en menor intensidad para Pucallpa; de igual manera la presencia de quinonas se encontró solo en el extracto de Ayacucho, saponinas en Pucallpa y alcaloides para Piura.

De igual manera en el conteo de polifenoles totales se mostró un mejor resultado para los extractos de Arequipa y Huamachuco con 1.007 mg y 1.047 mg respectivamente sobre Huánuco con una diferencia de medio miligramo aproximadamente ya que este último obtuvo 0.430 mg; demostrando así, que el lugar influye en la cantidad de polifenoles totales al igual que Kumazawa et. al.¹² quien realizó un conteo de polifenoles de propóleos de 14 países y los resultados mostraron un mayor resultado para el de China 299 mg seguido por el de Australia con 269 mg y en menor cantidad de Tailandia con 31.2 mg; en cuando a países sudamericanos incluidos en el estudio el que mostró mayor cantidad fue el de Chile con 210 mg seguido por Argentina en 212 mg, Uruguay con 187 mg y en menor cantidad Brasil con 120 mg; dejando bien establecido que el lugar de origen de propóleo va a determinar la cantidad de polifenoles totales.

Por último en la evaluación de la correlación de polifenoles y efecto antibacteriano se estimó en un 0.757, lo cual implica una relación directa entre ambas variables, con una diferencia significativa; esto se debe a que los polifenoles son fuente principal de acción antibacteriana sobre todo el ácido gálico y la catequina que han mostrado de forma individualizada su acción antibacteriana frente a cepas de E coli, Es así que queda demostrado que la presencia de polifenoles totales en mayor cantidad resulta

interesante para los fines del efecto antibacteriano en la inhibición del crecimiento bacteriano ya que a mayor cantidad mejor efecto antibacteriano.

I. CONCLUSIÓN

Todos los extractos de propóleos en todas las concentraciones mostraron un efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *S. mutans* a excepción del extracto de Huánuco en las concentraciones del 1% y 0.5% que no mostraron ningún efecto.

El propóleo de Arequipa al 10% presentó el mayor efecto antibacteriano (18.5 mm); el de Huamachuco al 2 % presentó un halo de 12.0 mm, mientras que el de Huánuco presentó el menor efecto antibacteriano con un halo de 10.0 mm.

La marcha fitoquímica realizada en el estudio donde se mostró una mayor concentración de metabolitos en los extractos de Arequipa y Huamachuco y en menor concentración en Huánuco.

Asimismo en el conteo de polifenoles que obtuvo una diferencia de medio gramo entre Arequipa y Huamachuco sobre Huánuco.

Recomendaciones:

Si bien los resultados obtenidos en este estudio son prometedores se recomienda realizar más estudios que comparen la ubicación geográfica de los propóleos pero con extractos en las mismas concentraciones para así observar si verdaderamente influye la ubicación en el efecto antibacteriano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pride D Edlund A, Tasha M, Rodríguez S, Boehm T,. Bacteriophage and their potential roles in the human oral cavity. *J Oral Microbiol.* 2015;7:27423. doi: 10.3402/jom.v7.27423.
2. Zaura E, Keijser BJB, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy core microbiome of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* 2009;9:259.
3. Napimoga M, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J. Oral Sci.* 2005; 47(2):59-64.
4. Avello M., Cisternas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. méd. Chile [Internet].* 2010; 138(10): 1288-1293.
5. Yaima Henry García; Suslebys Salomón; Jhoany Acosta; Aylema Romero; Marilín López; Josué Mercado. Optimización de las variables de extracción de flavonoides a partir de hojas de *Annona muricata* L. *Rev Cubana Plant Med.* 2016;21(3).
6. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica.* 2004; 45(1):21- 43.
7. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res.* 1999; 33(5):393-400
8. Ramírez T, Vilcapaza M. Efecto inhibitorio del extracto de propóleo sobre los

- microorganismos *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* que colonizan la cavidad oral en pacientes adultos de la clinica odontologica, una puno – 2016. Tesis para optar el título de cirujano dentista. Universidad Nacional del Altiplano. Puno 2016
9. Huayhua K, Nina S. Acción antimicrobiana del própolis de *apis mellifera* y de *salanum mammosum* (teta de vaca) contra microorganismos de la cavidad oral (*streptococcus mutans* y *streptococuss mitis*). *Ciencia y Desarrollo*. 2009; 10(1).
 10. Eguizábal M, Moromi H. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Odontol. Sanmarquina* 2007; 10(2): 18-20
 11. Soto M. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. In *Crescendo*. 2015; 6(2): 22-32.
 12. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84. 2004; 329–339.
 13. Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapeuticos* (Primera Edicion ed.). Santafe de Bogota: CYTED.
 14. Zhibing Wanga, Rui Suna, Yuanpeng Wangb, Na Lib, Lei Leib, Xiao Yang et. al. Determination of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by silica- supported ionic liquid-based matrix solid phase dispersion extraction high performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography B*. 2014; 969,

15: 205–212

15. Toreti V, Sato H, Pastore G, Yong Kun Park. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013
16. Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. J Ethnopharmacol. 2007; 5;113(2):278- 83.}
17. Díaz J, Proaño D. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de Porphyromonas gingivalis y Fusobacterium nucleatum. Rev Estomatol Herediana. 2011; 21(3):125-130.
18. Reyes C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis. [tesis]. Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
19. Peña, R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Ciencia e investigación agraria, 2008; 35: 17-26.
20. Bruschi M, de Araújo Pereira R, de Francisco L. The use of propolis in micro/nanostructured pharmaceutical formulations. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2015 Dec 29.
21. Vijay D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. Adv Pharmacol Sci. 2013; 2013

22. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999 Mar; 64(3):235-40.
23. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 2011 Jan 27;133(2):253-60
24. Fründ J, Zieger S, Tschardt T. Response diversity of wild bees to overwintering temperatures. *Oecologia.* 2013 Dec;173(4):1639-48.
25. Ostrowski F, Prosperi J, Jacques D. Potential Implications of Climate Change on *Aegilops* Species Distribution: Sympatry of These Crop Wild Relatives with the Major European Crop *Triticum aestivum* and Conservation Issues. *PLoS One.* 2016; 11(4)
26. Hallstan S, Trigal C, Johansson K, Johnson R. The impact of climate on the geographical distribution of phytoplankton species in boreal lakes. *Oecologia.* 2013 Dec;173(4):1625-38.
27. Asís, M. Apiterapia para todos. Como usar los siete productos de la colmena para curar. Ed. Científico Técnica. 1993. 60-96.
28. Cui-ping Z, Shuai H, Wen-ting W, Shun P, Xiao-ge S, Ya-jing L, Fu-liang H. Development of high-performance liquid chromatographic for quality and authenticity control of Chinese propolis. *J Food Sci.* 2014; 79(7):C1315-22.
29. Brobeck JR, Best R. Bases fisiológicas de la práctica médica. 10a ed. Ed. Panamericana, República de Argentina. 2006.

30. Bueno B, Alencar S, Koo H, Ikegaki M, Silva G, Napimoga M, Rosalen P. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem*. 2013 May 15; 61(19):4546-50.
31. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. 2001; 74(4):418-25.
32. Popova M, Chinou I, Marekov I, Bankova V. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry*. 2009; 70(10):1262-71.
33. Righi A, Alves T, Negri G, Marques L, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric*. 2011; 91(13):2363-70.
34. Tuominen A, Toivonen E, Mutikainen P, Salminen JP. Defensive strategies in *Geranium sylvaticum*. Part 1: organ-specific distribution of water-soluble tannins, flavonoids and phenolic acids. *Phytochemistry*. 2013; 95: 394-407.
35. Bankova V, De Castro S, Marcucci C. "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*, 2000; 31(1): 3–15.
36. Saborío L, Hidalgo Murillo L. Consumo De Arsénico Y Riesgo Cardiovascular. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2015; 32 (1): 1-5.
37. Rengifo R. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Revista Farmaciencia* Diciembre 2013; 1(2).
38. Sameni HR, Ramhormozi P, Bandegi AR, Taherian AA, Mirmohammadkhani M, Safari M. The effects of ethanol extract of propolis on histopathological changes

- and antioxidant defense of kidney in rat model for type 1 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2015
39. Koo H, Gomes BP, Rosalen PL, Ambrosano GM, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(2):141-8. PubMed PMID: 10716618.
40. Arencibia D, Rosario L, Curveco D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Rev de Toxicología en línea.* 2009: 41-53.
41. Hernández S., Lazo S., Junod M., Arancibia M. J, Flores S., Valencia A. et al. Características Organolépticas y Físico-Químicas de Propóleos de la Provincia de Ñuble, VIII Región-Chile. *ALAN.* 2005; 55(4): 374-380.
42. Libério SA, Pereira AL, Araújo MJ, Dutra RP, Nascimento FR, Monteiro-Neto V, Ribeiro MN, Gonçalves AG, Guerra RN. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. *J Ethnopharmacol.* 2009; 125(1):1-9.
43. Hamada, S., Slade H. Biology, immunology, and cariogenicity of *S. mutans*. *Microbiological Reviews.* 1980; 44, 331–384.
44. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res.* 1991; 25(5):347-51.
45. Park Y, Ikegaki M, Alencar S. Classification of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Mensagem Doce,* 2000 58, 2-7.

46. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999 Mar; 64(3):235-40.
47. Porte L, Braun S, Dabanch J, Egaña A, Andrighetti D. *Streptococcus mutans*: Una bacteria que hace honor a su nombre. *Rev. chil. infectol.* (Internet). 2009 (citado el 25 de febrero del 2017 Feb); 26(6): 571-571. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182009000700017&lng=es. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000700017>.
48. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES odontol.* (Internet). 2013 (citado el 25 de febrero del 2017); 26(1): 44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en.
49. Gamboa F. Identificación y caracterización, microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Univ Odontol.* 2014; 33(71): 65-73.
50. Yang Y, Park BI, Hwang EH, You YO. Composition Analysis and Inhibitory Effect of *Sterculia lychnophora* against Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:8163150.
51. Kim D, Hwang G, Liu Y, Wang Y, Singh AP, Vorsa N, Koo H. Cranberry Flavonoids Modulate Cariogenic Properties of Mixed-Species Biofilm through Exopolysaccharides-Matrix Disruption. *PLoS One.* 2015 Dec 29;10(12)

52. Loesche W. Role of *S. mutans* in human dental decay. Microbiological Reviews. 1986; 50, 353–380.
53. Chávez E. Adherencia del *S. mutans* después del uso de la IgY extraído de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas. [Tesis para optar al título de cirujano dentista]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima; 2009
54. Leverett DH, Proskin HM, Featherstone JD, Adair SM, Eisenberg AD, Mundorff-Shrestha SA, Shields CP, Shaffer CL, Billings RJ. Caries risk assessment in a longitudinal discrimination study. J Dent Res. 1993 Feb;72(2):538-43.
55. Lei L, Yang Y, Mao M, Li H, Li M, Yang Y, Yin J, Hu T. Modulation of Biofilm Exopolysaccharides by the *Streptococcus mutans* vicX Gene. Front Microbiol. 2015 Dec 21;6:1432.
56. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Vacca-Smith AM, Bowen WH. Inhibition of *S. mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. J Antimicrob Chemother. 2003; 52(5):782-9.
57. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica. 2002; 43 (1-2): 187-204.
58. Hinojosa J, Gutiérrez M, Siller F, Rodríguez A, Morales J, Guerrero P, et al. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Biotecnia. 2013; 15(2): 53-60.

Anexo 01

Ficha de recolección

Concentración mínima inhibitoria

Ciudad de recolección del Propóleo	Microorganismo	Concentración mínima inhibitoria

Caracterización Fitoquímica del Propóleo.

Ciudad de recolección de Propóleo	Dimensiones	Intensidad de presencia
	Taminos	
	Aminoácidos	
	Flavonoides	
	Esteroides	
	Quinonas	
	Cardenólidos	
	Alcaloides	

Anexo 02



UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE

Yo **EDISON VASQUEZ CORALES**, Jefe de Laboratorio de Química de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote.

Dejo constancia de haber colaborado en la realización de La Marcha Fitoquímica y el Contenido de Polifenoles Totales en muestras de propóleos con el estudiante **JAMES PIERRE SANCHEZ TORRES**, que ha ejecutado su trabajo de investigación que lleva por Título: **“COMPARACION DE LA MARCHA FITOQUIMICA DE TRES PROPOLEOS PERUANOS, Y SU EFECTO ANTIBACTERIANO FRENTE A CEPAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS-ATCC 25175”**


Mg. Q.F. Edison Vasquez Corales
JEFE LAB. QUIMICA I.V.M.

Anexo 03



Recoleccion de propoleo, para el cual se utilizo un traje especial facilitado por los apicultores para protegernos de las abejas.

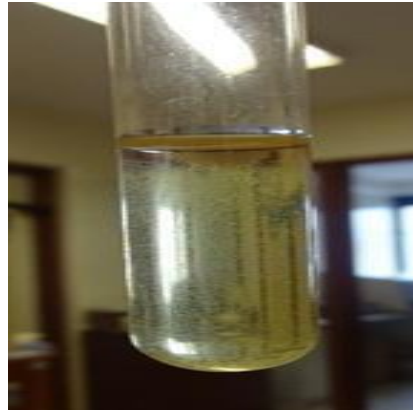
Anexo 04



Se trabajó con 10gr de propóleo en 100ml de etanol de 96° donde se observó una mezcla homogénea. Se desinfectaron, rotularon de la A-C y forraron los frascos con papel aluminio a continuación se pesaron en la balanza analítica 10 gr de cada propóleos, utilizando una espátula de acero inoxidable posteriormente se agregaron 100 ml de etanol a cada frasco; se taparon, agitaron y cubrieron con papel aluminio los 3 frascos para evitar el ingreso de luz. Los frascos con EEP fueron llevados al equipo de baño maría a 45°C por 60 minutos. Pasado se dejaron las muestras en baño maría para el proceso de maceración por 24 horas a temperatura ambiente.

Anexo 05

Activación de la bacteriana



Se incubó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a 37°C por 24 horas en 2 tubos de BHI conteniendo 6 mililitros cada uno.



Streptococcus activado.

Anexo 06

Enfrentamiento antibacteriano

