



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

**COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE
LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPOLEO
RECOLECTADO EN SANTIAGO DE CHUCO EN LAS
ESTACIONES DE VERANO Y OTOÑO SOBRE EL
CRECIMIENTO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC
25175)**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA

AUTORA

BACA BECERRA, THALIA

ASESOR

VÁSQUEZ PLASENCIA, CESAR ABRAHAM

TRUJILLO– PERÚ

2018

1. TÍTULO DE LA TESIS

**COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS
EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPOLEO RECOLECTADO
EN SANTIAGO DE CHUCO EN LAS ESTACIONES DE VERANO
Y OTOÑO SOBRE EL *CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS
MUTANS (ATCC 25175)***

FIRMA DEL JURADO Y ASESOR

Dr. Elias Ernesto Aguirre Siancas

Presidente

Mgtr. Edwar Richard Morón Cabrera

Miembro

Mgtr. Juan Luis Pairazaman García

Miembro

Mgtr. Cesar Abraham Vásquez Plasencia

Asesor

AGRADECIMIENTO:

A DIOS por estar a mi lado siempre, sosteniéndome en los mejores y peores momentos de mi vida, porque nunca me ha fallado, porque siempre me dio todo lo que con fé le pedí.

A mis padres y hermanos por el apoyo económico, porque nunca me privaron de nada y a pesar de su peculiar forma de amarme sé que lo hacen, no importa cuánto me costó entenderlos, no importa cuánto les cueste verme crecer.

A mis amigos por sus grandes palabras de aliento en los momentos más difíciles, porque en momentos oscuros nunca me dejaron sola, nunca me dejaron rendirme y nunca dudaron que lograría levantarme.

A mi asesor Dr Pablo Millones no solo por su constante apoyo en la realización de mi proyecto, sino por mostrarme el fascinante mundo de la investigación, por ayudarme a encontrar mi camino y vocación.

DEDICATORIA

A mi madre quien en mí cumple su último sueño, ver a su última hija convertirse en una profesional; este es su sueño y al culminarlo empiezo a trazar los míos, solo Dios sabe cuánto nos ha costado tener la relación de la que gozamos hoy, te amo, eres mi razón de querer ser mejor cada día.

Quiero dedicarle esto principalmente a mi hermana Manqueli Judith Baca Becerra por ser la persona que me apoyo desde que decidí embarcarme en esta aventura que es Odontología, por ser el SI en medio de todos los NO, por decirme que si puedo cuando me decían que renunciara, por cumplir tu promesa de ayudarme siempre; porque la odontología no es mi mundo es el suyo, sin embargo no permitió que me sintiera sola, sino que se mantuvo firme conmigo en cada paso que daba, por no rendirse nunca conmigo, por el apoyo incondicional, por trasnocharse cuando yo debía trasnocharme, por madrugar cuando yo debía madrugar, por amanecerse cuando yo debía amanecerme, incluso por cada riña. Es por eso que cada logro que consiga y paso importante que dé y lleve la palabra odontología le pertenece también.

4. RESUMEN

El propóleo es una sustancia gomo-resinosa elaborada por las abejas, producto de la recolección de yemas y exudados de plantas. Su actividad antibacteriana ha sido ampliamente estudiada, sabiendo que dicha actividad puede variar según, origen geográfico, tipo de flora circundante, especie recolectora, modo de recolección e incluso la estación en la cual es recolectada. Lamentablemente no se han podido corroborar mediante estudios. El objetivo fue comparar la efectividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se recolectaron las muestras en verano y otoño, las que fueron rotuladas como A y B por una persona ajena al estudio, se prepararon extractos etanólicos de propóleo al 5% por cada muestra. Las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 se activaron para ser sembradas en placas con Agar Cerebro Corazón; se les realizaron pocillos y se dividieron en cuatro grupos para el enfrentamiento antibacteriano de ambos extractos más controles, positivo (digluconato de clorhexidina 0.12%) y negativo (etanol 96°). Empleando la prueba T-student, se mostró un halo de inhibición de 26.4 ± 2.6 mm. para el extracto recolectado en otoño, de 18.2 ± 1.8 mm para verano, 0 mm para el control negativo y por último de 13mm para el control positivo. Con una diferencia significativa a favor del extracto recolectado en otoño a comparación del recolectado en verano se concluye que la estación en que se recolecta el propóleo sí influye sobre el crecimiento de *S. mutans*.

Palabras Claves: Propolis, clima, S mutans, efectividad antibacteriana

ABSTRACT

Propolis is a gomo-resinous substance made by bees, the product of the collection of buds and exudates of plants. Its antibacterial activity has been widely studied, knowing that this activity can vary according to geographical origin, type of surrounding flora, collecting species, mode of collection and even the season in which it is collected. Regrettably, they have not been corroborated by studies. The objective was to compare the antibacterial effectiveness of the ethanol extracts of propolis collected in Santiago de Chuco in the summer and autumn seasons on the growth of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. The samples were collected in summer and autumn, which were labeled as A and B by a person outside the study, ethanol extracts of propolis at 5% were prepared for each sample. Strains of *S. mutans* ATCC 25175 were activated to be plated on Heart Brain Agar plates; wells were performed and divided into four groups for the antibacterial challenge of both extracts plus controls, positive (chlorhexidine digluconate 0.12%) and negative (96% ethanol). Using the T-student test, an inhibition halo of 26.4 ± 2.6 mm was shown. for the extract collected in autumn, 18.2 ± 1.8 mm for summer, 0 mm for negative control and lastly 13 mm for positive control. With a significant difference in favor of the extract collected in autumn compared to that collected in summer, it is concluded that the season in which propolis is collected does influence the growth of *S. mutans*.

Key Words: Propolis, climate, S mutans, antibacterial effectiveness

5. CONTENIDO

1. TITULO DE LA TESIS.....	ii
2. HOJA DE FIRMA DEL JURADO Y ASESOR.....	iii
3. HOJA DE AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA.....	iv
4. RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vi
5. CONTENIDO.....	viii
6. ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA... ..	2
III. HIPOTESIS	14
IV. METODOLOGIA	14
4.1. Diseño de la investigación.....	14
4.2. Universo y población	14
4.3. Definición y operacionalización de variables.....	16
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	17
4.5. Plan de Análisis	24
4.6. Matriz de consistencia.....	25
4.7. Principios éticos.....	27
V. RESULTADOS	28
5.1. Resultados.....	28
5.2. Análisis de resultados	32
VI. CONCLUSIONES	35
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	37
Anexo.....	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Comparación in vitro del efecto de los extractos etanólicos del propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	28
Tabla 2	Comparación in vitro del efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño frente al etanol 96% sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	29
Tabla 3	Comparación in vitro del efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño frente digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 2517.	30
Tabla 4	Comparación de la marcha fitoquímica de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño.	31

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Comparación invitro del efecto de los extractos etanólicos del propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	48
Gráfico 2	Comparación invitro del efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estacione de verano y otoño frente al etanol 96% sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	48
Gráfico 3	Comparación invitro del efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño frente digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	49

I. INTRODUCCIÓN

El propóleo es una sustancia gomo-resinosa elaborada por las abejas, producto de la recolección de yemas y exudados de plantas, con β -glucosidasa que se encuentra en las secreciones de las glándulas y la hipofaringe de las abejas. La palabra propóleo deriva del griego pro que significa defensa y polis que significa comunidad o ciudad es decir significa en defensa de la ciudad haciendo referencia a la colmena ya que usan este producto para sellar grietas y agujeros en las paredes de la colmena, asimismo para embalsamar insectos invasores con la finalidad de autoprotegerse.^{1,2}

Por lo general el propóleo está compuesto por resinas, ceras, polifenoles, polisacáridos, materias volátiles, y además de otras sustancias. Este producto es conocido desde la antigüedad por poseer diversas propiedades biológicas y farmacológicas como antiviral, anti fúngica, antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, inmunomodulador y principalmente antibacteriana, estas propiedades están directamente relacionada con sus compuestos orgánicos siendo principalmente los polifenoles como flavonoides; asimismo terpenoides, esteroides, naftaleno, derivados de estilbeno y los ácidos grasos.^{1, 3,4,}

Su enfoque ha ido principalmente dirigido hacia su actividad antibacteriana ya que inhibe bacterias del tipo gram positivas; por otro lado aunque se sabe que dicha actividad puede variar según la técnica de purificación, tipo y concentración del disolvente que se emplea para su purificación, su origen geográfico, tipo flora circundante, especie recolectora, modo de recolección, temporada e incluso la estación en la cual es recolectada; no se han podido corroborar mediante estudios enfocados en evaluar esas variables exclusivamente.⁴ El objetivo de este estudio de investigación es

comparar la efectividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 2517.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. Antecedentes:

Veloz et. al. ⁵ (2015) en su estudio Antibiofilm Activity of Chilean Propolis on *Streptococcus mutans* Is Influenced by the Year of Collection evaluaron si el año de recolección de los propóleos influye en su actividad contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Emplearon extractos de propóleos ricos en polifenoles recolectados en tres años diferentes (2008, 2010, 2011), cuantificaron el contenido de polifenoles totales y grupos de flavonoides y evaluaron el efecto antibacteriano en *Streptococcus mutans* a través de la formación de halo de inhibición y la formación de biopelículas. Como resultado obtuvieron que hubo diferencia en el conteo de polifenoles totales, flavonas y flavonoles para el año 2010, y la composición química entre los extractos. No hubo diferencia entre la actividad antimicrobiana sobre *S. mutans*, sin embargo existió una diferencia significativa en la formación de la biopelícula, donde se vio una mayor actividad en el año 2010. Concluyeron que la actividad de extractos ricos en polifenoles de propóleo chileno depende del año de recolección

Samara et al ⁶ (2010), en su estudio Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial evaluaron la actividad antimicrobiana de dos extractos etanólicos de propóleo derivados de apícolas localizados en Buenos Aires, con temperatura de 23°C a 1.225 m.s.n.m. y Totoró en a una temperatura de 14°C, a 2.750 m.s.n.m. Los resultados mostraron un efecto bactericida de ambos extractos; el de Buenos Aires

inhibió a *P. aeruginosa* a una concentración significativamente menor que el de Totoró, asimismo mostró una mayor diversidad química, lo que sugiere que la presencia de compuestos están implicados dicha inhibición. Por lo que concluyeron que los resultados pueden estar sujetos a la variedad química en la flora y posiblemente al clima del lugar.

Jara ⁷ (2014) en su estudio Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) evaluó el efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* donde comparó a cuatro marcas de propóleo comercial con un extracto metanólico de propóleo de Oxapampa, se midió el efecto antibacteriana a través de halo de inhibición formado en los pocillos y se usó clorhexidina al 0.12% como control. Los resultados mostraron que el extracto metanólico de propóleo de Oxapampa mostró los mayores halos de inbición una media de 33.15 + 3.26 mm frente a las cepas de *Streptococcus mutans* por otro lado clorhexidina al 0.12% presento un halo de 25.6mm + 3.8 mm. Concluyeron que el extracto metanólico de propóleo de Oxapampa es un potente antibacteriano a comparación de las otras marcas comerciales.

Huayhua et al.⁸ (2009) en su estudio Acción antimicrobiana del própolis de apis mellifera y de salanum mammosum (teta de vaca) contra microorganismos de la cavidad oral (*streptococcus mutans* y *streptococcuss mitis*) compararon las propiedades antibacterianas del propóleo en distintas contentraciones y de la teta de vaca sobre cepas de *Streptococcus mitis* y *Streptococcus mutans* para lo que emplearon cultivos de medio Mueller-Hinton, donde se aplicó propóleo de Apis mellifera en tintura al 5 % y 10 %, asimismo como control se utilizó amoxicilina. Para ver el efecto

antimicrobiano se midieron los halos de inhibición donde el propóleo de *Apis mellifera* al 10 % tiene un mejor efecto frente al *S. mutans* formando un halo de 24 mm de diámetro mientras que el propóleo al 5 % mostro un halo de 20mm y la amoxicilina de 21mm; basándose en sus resultados es que concluyeron que es buena opción elaborar pastas dentales con propóleo al 10%.

Ramírez et al ⁹ (2016) en su 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 clinica odontologica, una puno – 2016 determinaron el efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 25%, 50%, 75% y 100 %, sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* de pacientes con caries dental activa donde midió el halo de inhibición que se formaba al aplicar dichos extractos. Los resultados mostraron un efecto antimicrobiano sobre *S. mutans* en todas las concentraciones teniendo el mayor efecto al 100% con un halo de 14.25mm, al 75% 11.7mm, al 50% 10.5mm y al 25% 7.5 mm. Por lo que concluyeron que a mayor concentración mayor actividad inhibitoria frente a *S. mutans*.

Eguizábal et al.¹⁰ (2007) en su 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* ATCC 25175 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, para esto empleó cultivos con cepas de *S. mutans* y *L. casei*; midió los halos de inhibición formados al enfrentarse con las distintas concentraciones de los extractos empleando como control clorhexidina al 0,12 % y alcohol al 70 %. Los resultados mostraron un mayor efecto inhibitorio contra *S. mutans* para todos los extractos de propóleos a comparación de los controles; dando $13,56 \pm 3,04$ mm para

el 0.8%; $12,00 \pm 1,87$ mm para 20%; $12,33 \pm 1,75$ mm para 30 % y $11,72 \pm 1,50$ mm y $9,61 \pm 1,98$ mm para clorhexidina y alcohol respectivamente. Esto les permitió concluir que a menor concentración de propóleo hay un mayor efecto antimicrobiano.

Soto¹¹ (2015) en su estudio Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú determinó 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 la identificación de metabolitos; y cuantificando los fenoles y flavonoides totales con el método de Folin-Ciocalteu y el de formación de complejos con $AlCl_3$ al 2 %. Los resultados mostraron la presencia de metabolitos secundarios como catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, fenoles y taninos en los extractos etanólicos de los tres propóleos, además se encontró alcaloides solo en Piura, saponinas en Pucallpa y quinonas en Piura y Ayacucho llegando a la conclusión que debido a las diferencias significativas entre regiones se sustenta la necesidad de estandarizar los tipos de propóleos en el Perú.

2.2.Bases Teóricas de la Investigación:

2.2.1. Propóleo

2.2.1.1.Concepto

El propóleo una sustancia gomo-resinosa que se ha empleado desde tiempos muy remotos, es elaborada por las abejas *Apis mellifera* producto de la recolección de yemas y exudados de plantas; que son mezclados con β -glucosidasa que se encuentra en las secreciones de las glándulas y la hipofaringe de las mismas. La palabra propóleo deriva del griego pro que significa defensa y polis que significa comunidad

o ciudad es decir en defensa de la ciudad, haciendo referencia a la colmena ya que usan este producto para sellar grietas y agujeros en las paredes de la colmena, y embalsamar insectos invasores.^{12, 13,14.}

La forma física del propóleo puede variar según la temperatura a la que se somete, si esta es más caliente su consistencia será más maleable, sin embargo cuando más es más rígida y quebradiza. Asimismo su color y tonalidad también varía debido a la diversidad en su composición química presentándose desde amarillas o verdosas en países de Europa y Brasil, rojo en Cuba e incluso negruzcas o pardas en Perú. Dicha diversidad se debe a su composición química diversa la cual depende del tipo de flora circundante a las colmenas^{15, 16, 17, 18.}

2.2.1.2. Antecedentes Históricos del Propóleo

El propóleo es un producto que se ha empleado desde la antigüedad; los egipcios empleaban propóleo como anti-putrefante con el fin de embalsamar a sus muertos y conservarlos, los griegos y romanos como agente antiséptico y cicatrizante y los incas como un agente antipirético; fue nombrada en las farmacopeas de Londres durante el siglo XVII como un medicamento oficial por su actividad antibacteriana.^{19,20.}

En los tiempos más modernos, el propóleo comenzó a ganar mayor reconocimiento en los años 1950 y 1960 en la antigua Unión Soviética y los países de Europa del Este, empleando el propóleo para el tratamiento de otitis externa, faringitis, rinitis crónica, amigdalitis, asma bronquial y entre otras dolencias. Durante la Segunda Guerra Mundial se empleó para el tratamiento de la tuberculosis debido a la disminución de los problemas de los pulmones y la recuperación del apetito, en los Estados Unidos, para el tratamiento de heridas, quemaduras, dolor de garganta, y la úlcera de estómago.

Asimismo en los países de Europa Occidental, América del Norte y del Sur y en Japón, el propóleo adquirió popularidad a partir de 1980. En la actualidad su uso continúa como un remedio popular disponible en cualquiera tanto en su estado puro o combinado con otros productos naturales. El primer trabajo científico con propóleos, se publicó en 1908, incluyendo sus propiedades químicas y composición indexado más al abstracto químico^{19,20, 21, 22}.

2.2.1.3. Características Organolépticas

Según lo establecido por Hernández et. al. estas son: ¹³

- **Presentación:** Granos, trozos, briquetas, escamas, bloques, polvo.
- **Aspecto:** Al realizar un corte este puede presentar diferencia entre color externo e interno, leve diferencia al corte o no presentar ninguna diferencia entre color externo e interno.
- **Consistencia:** Dura, quebradiza, terrosa, pegajosa
- **Olor:** Resinoso, aromático, aromático suave, aromático floral.
- **Color:** Verde oscuro, castaño o rojo, amarillo, pardo o gris, naranja, marrón, castaño blanco, negro, opaco.
- **Sabor:** Insípido, picante, amargo, dulce, resinoso.
- **Impurezas visibles:** Pocas, muchas, media.

2.2.1.4. Composición

La composición del propóleo es muy variable, alrededor de los años 60 del siglo pasado, se creía que pese a tener una gran complejidad química esta era constante, pero, en los años siguientes, diversos análisis mostraron que su composición química es variable e incluso difícil de estandarizar debido a que depende de distintos factores

como: el tipo de vegetación, la raza de las abejas, método de recolección y la estación o clima en la que se recolecta. ^{24, 25.}

A lo mencionado en términos generales los propóleos están compuesto por resinas (40%), ceras (23-30%), polifenoles (14-16%), polisacáridos (2,5%), materias volátiles (> 10%), y otras sustancias ^{12, 13, 14, 26, 27}

2.2.1.5.Recolección

- **Abejas Recolectoras:**

El género *Apis* recolector es *A. mellifera*, esta se encuentra ampliamente extendida en Europa, Montes Urales, África y Asia. Estudios anteriores han demostrado que las variedades de especies de *A. mellifera* afectan a la actividad antibacteriana de propóleo debido a que cada especie tiene una afinidad botánica diferente; por ejemplo *A. mellifera carnica urticaria* mostraron actividad antibacteriana mucho más débil que la de *A. anatolica mellifera* y *A. mellifera caucasica*. Por otro lado *Melipona scutellaris*, produjo propóleos con benzofenonas, pero no flavonoides, producidos por *Melipona fasciculada* contiene altas concentraciones de polifenoles, flavonoides, triterpenoides, saponinas, e incluso taninos. ²⁸

- **Clima:** Las consecuencias del cambio climático a nivel global para los ecosistemas naturales pueden afectar su funcionamiento y actividad biológica. Debido a que la distribución de muchas especies varían; cambiando así la flora y produciendo una clara variedad relacionado con la biodiversidad, el rango, la historia y la evolución de las especies de plantas e incluso se cree que el clima produce cambios en el flujo de genes desde los cultivos a la maleza. Por otro lado se cree también que muchas especies se adaptarían a dichos cambios climáticos respondiendo de manera

diferente al clima, siendo más persistente en las diferentes condiciones climáticas sin embargo como resultado también habría un cambio en la composición que tendrían consecuencias importantes sobre su actividad biológica.^{29, 30, 31.}

- **Estaciones De Recolección**

- ❖ **Primavera:** Empieza con el solsticio de primavera y finaliza con el equinoccio del verano, hablando de una forma astronómica empieza el 23 de septiembre hasta 21 de diciembre. Graça y cols en su investigación donde comparaba el propóleo recolectado en primavera e invierno mostraba que no existía diferencia significativa en ambas sin embargo refería que los resultados no eran certeros debido a que no era la variable principal del estudio.³²

- ❖ **Verano:** Empieza con el solsticio de verano y finaliza con el equinoccio de otoño, hablando de una forma astronómica empieza el 22 de diciembre hasta el 21 de marzo. Se cree que las abejas tienen una preferencia de recolección de propóleos en verano por ser un clima cálido lo que favorece al crecimiento de una mayor diversidad de especies vegetales preferentes por las abejas y por consecuencia una composición química más variada. En Brazil se ha comprobado que hay mayor producción de propóleo en el verano sobre otoño, existiendo alguna variación química debido a la estacionalidad.^{33,34.}

- ❖ **Otoño:** Empieza con el solsticio de otoño y finaliza con el equinoccio de invierno, hablando de una forma astronómica empieza el 22 de marzo hasta el 21 de junio. Pese a que se cree que el verano es la época preferida por las abejas para su recolección

estudios han mostrado que en Venezuela las abejas producen mayor cantidad de propóleo en épocas de lluvias y en las regiones con altas temperaturas y montañosas por lo que composición química y la variación estacional puede variar también las fuentes vegetales y así mismo alterar la actividad biológica.³⁴

❖ **Invierno:** Empieza con el solsticio de invierno y finaliza con el equinoccio de primavera; hablando de una forma astronómica empieza el 22 de junio y finaliza el 22 de setiembre. Se caracteriza por ser la estación con los días más cortos y noches más largas lo cual causa una influencia en el estado de ánimo de los seres vivientes. Cremonte et. al. estudio el estado de ánimo y su relación con los cambios climáticos en un grupo de alumnas, los resultados que obtuvo fueron que en el invierno estas presentan emociones más negativas; esto también podrá ser una variable ya que también podría influir en el estado de ánimo de las abejas y su elaboración de propóleo.³⁵

- **Métodos de Recolección**

La calidad del propóleo se basa en los métodos de recolección que se emplean por lo mismo existe diversos métodos para la recolección de propóleo siendo el más utilizado el raspado con una espátula metálica sin embargo estudios han indicado que el metal podría contaminar y oxidar los componentes bioactivos de la sustancia, se cree que otros métodos podrían ser más eficientes como el de rejillas plásticas debido a que por su forma estimula la producción de propóleo y debido al plástico no alteraría las

propiedades del mismo otros también empleados con menos frecuencia son el colector de propóleos inteligente, mallas Apifey, y las tipo mosquitero.^{36,37.}

2.2.1.6.Composición Química

- **Flavonoides**

Contribuyen en gran medida a las actividades farmacológicas del propóleo debido a que poseen un amplio espectro de propiedades biológicas, como efectos antibacterianos, antivirales y anti-inflamatorias razón por la cual se utiliza como un criterio para evaluar la calidad del propóleo. En propóleos se clasifican según su estructura química en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonol, chalconas, dihidrochalconas, isoflavonas, isodihydroflavones, flavanos, isoflavans y neoflavonoids. Además, glucósidos flavonoides que son muy raros han sido identificados en el propóleo; al igual que isorhamnetin-3- O -rutinoside y flavona C -glycoside.²⁸⁻⁴²

- **Terpenoides**

Representan sólo el 10% de los componentes de propóleos, son quienes le asignan ese olor resinoso característico y contribuyen a los efectos farmacológicos del propóleo principalmente a sus propiedades antioxidante y antimicrobiana. Los terpenoides aislados de propóleos están compuestos por acíclico, monocíclico, monoterpenos dicíclicos y sus derivados. Los monoterpenos acíclicos y monocíclicos primarios son myrcenes, p -menthanes y cineoles, respectivamente. Los monoterpenos diciclicos en el propóleo se clasifican en cinco grupos: thujanes, caranes, pinanes, fenchanes y camfenes. Sesquiterpenos son los componentes químicos más abundantes en el propóleo.²⁸

- **Compuestos Fenólicos**

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. Aparte existen otros compuestos que no suelen ser muy comunes como estilbenos, petrova, geranylstilbenes, schweinfurthin, schweinfurthin , estilbeno, 5-farnesil-3'-hydroxyresveratrol, lignanos, etc. ^{28, 43}

- **Otros**

- **Azúcares:** Su origen se cree que provienen de glucosa, fructosa y sacarosa de las plantas; otros sugieren que proceden de glucósidos flavonoides hidrolizados en el propóleo.²⁸
- **Hidrocarburos:** Son otros componentes básicos del propóleo; se ha identificado , alcanos, alquenos, alcadienos, monoésteres, diésteres, ésteres aromáticos, ácidos grasos y esteroides en diferentes propóleos del mundo³⁰
- **Minerales:** Se han encontrado componentes no tóxicos como Ca, K, Mg, Na, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr y Zn; y así mismo también elementos tóxicos como As, Cd, Hg y Pb, estos elementos minerales son útiles para la identificación de propóleos en función de su ubicación.²⁸

2.2.1.7. Actividad Biológica

En las últimas cuatro décadas debido a grandes descubrimientos el uso del propóleo como una terapia alternativa ha ido aumentando, siendo utilizado para muchas investigaciones con la finalidad de determinar sus componente químicos así como sus actividades biológicas a las cuales se le atribuyen a los ácidos fenólicos, ésteres de

ácidos fenólicos, flavonoides y terpenoides como Catequina, Artepillin C, ácido cafeico, crisina, quercetina, galangina, apigenina, kaempferol, pinobanksina 5- metil éter, pinobanksina, pinocembrina y pinobanksina 3-acetato quienes les dan el efecto antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, entre otros. ^{44-49.}

- **Actividad Antibacteriana**

Una de las propiedades biológicas del propóleo fuente de mayores investigaciones es la actividad bacteriana que ha mostrado tener un efecto tanto para bacterias gram positivas como negativas teniendo un mayor efecto sobre bacterias gram positivas; una de las primeras investigaciones sobre las propiedades antibacterianas del propóleo fue por Kivalkina en 1948, y desde entonces se ha analizado su efecto en diversas bacterias de diversos tipos. ^{23, 48,50.}

En el área de odontología uno de los principales microorganismos que forma el biofilm de la caries es el *S. mutans* quien el propóleo no solo ha probado su capacidad de inhibirlo en su totalidad sino que también ha logrado demostrarse su capacidad para inhibir uno de sus factores de virulencia como es la glucosiltransferasa que por su acción puede sintetizar polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa, sintetizando glucanos hidrofóbicos que van a permitir la agregación del *S. mutans* a la superficie dentaria y la coagregación de otros microorganismos ^{51, 52,53.}

Uno de los primeros estudios en corroborar esto fue el de Ikeno y cols quienes observaron que el propóleo inhibe parcialmente la actividad de la glucosiltransferasa en un porcentaje que va desde 40 % a 61 % dependiendo de las especies de bacterias, asimismo Koo y colaboradores mostraron que habían diferentes niveles de acción inhibitoria sobre distintos tipos de glucosiltransferasas. ^{50, 53}

- **Mecanismo de Acción Antibacteriano:**

Su mecanismo de acción aún no está del todo claro, pero se le ha atribuido su actividad a una especie de sinergismo entre sus compuestos principalmente los que se encuentran en las resinas.^{54.}

2.2.1.8. Usos Terapéuticos

Desde la antigüedad el propóleo se ha usado en distintas partes del mundo para tratar distintas enfermedades o dolencias siendo empleado como un potente antiviral, para la eliminación de hongos como antifúngico, para evitar la formación de óxidos como antioxidante, para la desinflamación de heridas o infecciones como antiinflamatorio, para prevenir la formación de tumores como antitumoral, para fortalecer el sistema inmune como inmunomodulador y principalmente para tratamiento de infecciones como antibacteriano^{12, 13, 14, 26}

III. HIPÓTESIS

- Si existe diferencia en el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

IV. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de la investigación

Experimental, prospectivo, transversal y analítico.

4.2. Universo y población

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

Muestra: La muestra determinada por el estadístico fue un total de 6 repeticiones divididas en dos por cada placa Petri para cada grupo experimental. Para determinar el tamaño muestral se aplicó la siguiente fórmula:

$$n = 2 \left(\frac{Z_{\alpha}^2}{2} + Z_{\beta}^2 \right) \frac{(DE)^2}{d^2}$$

Dónde:

n: tamaño de muestra para el grupo de estudio.

α : probabilidad de cometer error tipo I.

β : probabilidad de cometer error tipo II.

Z: valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: desviación estándar.

d: diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias.

Requerimientos:

De una confianza al 95% ($\alpha=0.05$, $Z=1.96$), y una potencia en la prueba del 80% ($\beta=0.20$, $Z=0.84$), para ($DE/d=0.60$).

$$n = 2(1.96 + 0.84)^2(0.6)^2$$

$$n = 6$$

4.3. Definición y operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	VALORES Y CATEGORIAS	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN
Estaciones	Son periodos del año donde se mantienen las mismas condiciones climáticas en un determinado lugar durante un determinado tiempo.	Periodo del año donde se presenta mayor efectividad antibacteriana tras la aplicación de extracto etanolico sobre <i>S. mutans</i>	calendario	Verano	Cualitativo	Nominal
				Otoño	Cualitativo	Nominal
Efecto antibacteriano	Es la división celular genéticamente idénticas de un microorganismo mediante el proceso fusión binaria.	Efecto en el cual tras la aplicación de extracto etanolico de propóleo va a repercutir en el crecimiento del <i>S. mutans</i>	Halo de inhibición	mm	Cuantitativo	De razón

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

La técnica empleada fue la observación microbiológica y el método fue microbiológico. Para la evaluación se utilizó una ficha de recolección de datos (anexo 1)

4.4.1. De la obtención del Propóleo.

Se siguió el protocolo de Quintero et. al.⁵⁵ (2011) con algunas modificaciones. El propóleo fue obtenido de Santiago de Chuco, directamente de los apicultores con una espátula plástica en dos diferentes estaciones del año (verano y otoño). Las muestras se colocaron directamente en tapers de vidrio translucido, atóxico y cubierto con bolsas oscuras de polietileno, fueron selladas y transportadas al laboratorio de Bioquímica de la escuela de Farmacia de la Universidad Nacional de Trujillo para su procesamiento.

4.4.2. De la obtención del extracto

Para la realización del extracto se siguió el protocolo de Tolosa⁵⁶ con algunas modificaciones:

Se trabajó el propóleo en bruto con la proporción del 10gr en 100ml de etanol de 96° consiguiendo una mezcla homogénea.

Para cual se hizo los siguientes procedimientos:

- Se desinfectaron con etanol los frascos color ámbar, y se rotularon de A y B con la finalidad de cegar las muestras de propóleos por una persona ajena al estudio.
- Se pesaron (balanza analítica) 10 gr de cada propóleo, utilizando una espátula de acero inoxidable para transportar el material a la balanza.
- Se agregaron 100 ml de etanol a cada frasco.

- Se taparon, agitaron los 2 frascos de color ámbar para asegurar el no ingreso de luz.
- Se llevaron los frascos con EEP 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 1 semana a temperatura ambiente.

Filtración Al Vacío:

- Cumplido 1 se llevaron las muestras para el procedimiento de filtración al vacío en caliente para lo cual se emplearon los siguientes materiales: un embudo, papel de filtro, un matraz de destilación para cada propóleo, previamente lavados, desinfectados, y rotulados con la letra A y B; una bomba de membrana conectada a oliva lateral de un dispositivo de vidrio que unía al embudo y el matraz para no permitir el ingreso de aire o el escape de sustancias.

Procedimiento:

- Se encendió la bomba de membrana al vacío.
- Agitación leve del frasco con la muestra.
- Se aplica el proceso de filtración al vacío.
- Una vez terminado el proceso de filtración de cada muestra se procedió a colocar la tapa del matraz.
- 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

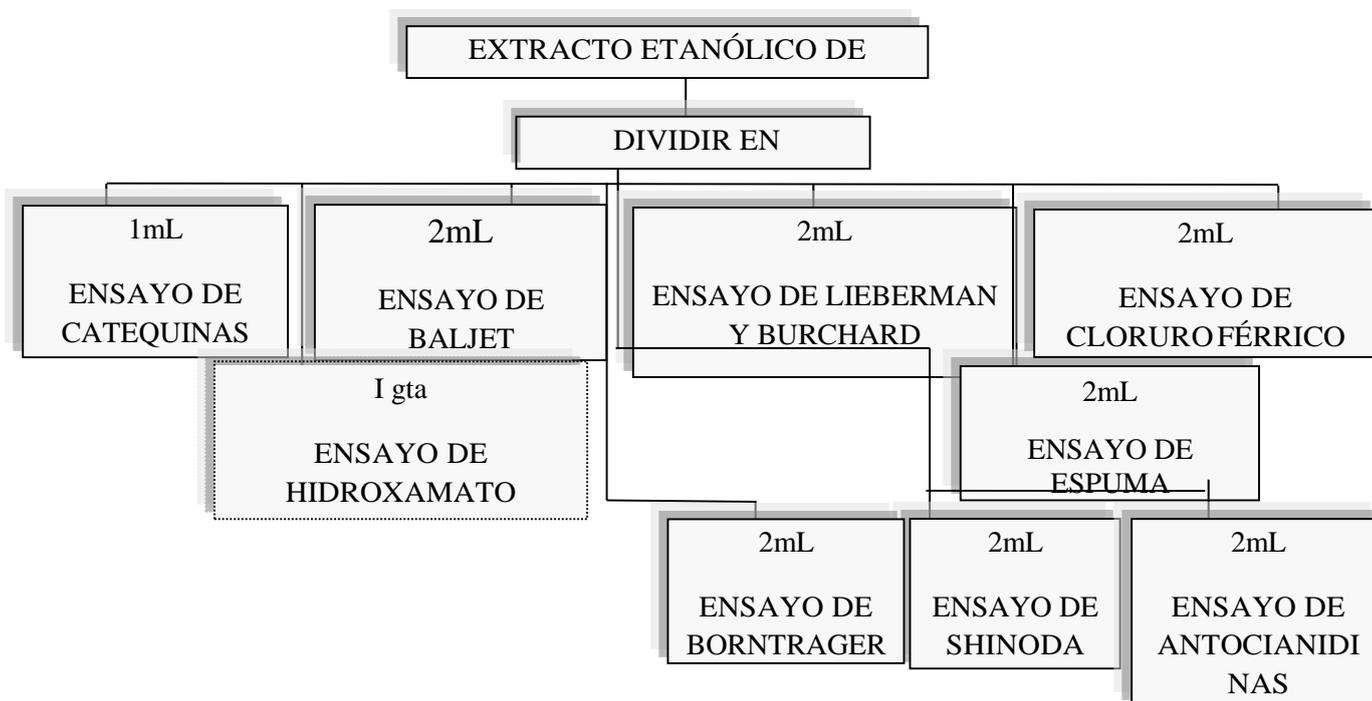
- Se sacaron todas las muestras de refrigeración y se dejaron que estas alcanzaran temperatura ambiente.
- Se realizaron previos ensayos de solubilidad utilizando tubos de ensayo con diferentes cantidades equivalentes de EEP y cantidades equivalentes al etanol en

100 ml. Con la finalidad de conocer en qué porcentaje se encuentra la máxima solubilidad del EEP.

- Cuando se encontró el porcentaje de su máxima solubilidad fue la concentración que se tomó.

4.4.4. De la marcha Fitoquímica del propóleo

Para la marcha fitoquímica se empleó la “Prueba de la gota” de Olga Lock ⁵⁷ de Ugaz.



A partir de una muestra de ambos extractos etanólicos de propóleo (A y B) y se dividieron en 9 tubos de ensayo (5ml) por muestra y se rotularon del 1 al 9 donde:

Tubo N°1- FeCl₃ para fenoles:

- ❖ Se agregaron los tubos N° 1 de ambos extractos 20 gotas del reactivo : FeCl₃
- ❖ Se esperó unos minutos para ver la reacción química

- ❖ Para esta prueba se consideró positiva la aparición de un complejo coloreado permanente (normalmente púrpura, verde o azul) que permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 2-Shinoda para flavonoides:

- ❖ Se agregaron los tubos N° 2 de ambos extractos limaduras de magnesio seguido por gotas ácido clorhídrico concentrado
- ❖ Se esperó unos minutos para ver la reacción química
- ❖ Para esta prueba se consideró positiva la aparición de un complejo coloreado donde las coloraciones rojas indican preliminarmente la presencia de flavonas, la coloración roja a crimson, la presencia de flavonoles, y crimson a magenta, flavanonas; algunas veces azul o verde, también son consideradas positivas.
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 3-Espuma para saponinas:

- ❖ Se agregaron los tubos N° 3 de ambos extractos agua destilada esteril
- ❖ Se procedió a agitar con rapidez
- ❖ Para esta prueba se consideró positiva la aparición de espuma
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 4 para alcaloides

- ❖ Se dividieron en 3 tubos por muestra de 5ml cada uno

Tubo N° 4.1- Dragendorff

- Se agregaron a los tubos N° 4.1 de ambos extractos 2 gotas del reactivo Dragendorff
- Se esperó unos minutos para ver la reacción química
- Para esta prueba se consideró positiva la aparición de precipitados característicos de color rojo o anaranjado
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 4.2- Mayer

- Se agregaron a los tubos N° 4.2 de ambos extractos 2 gotas del reactivo Mayer.
- Se esperó unos minutos para ver la reacción química
- Para esta prueba se consideró positiva la aparición de precipitados característicos de color color blanco, blanco amarillento
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 4.3- Hager

- Se agregaron a los tubos N° 4.3 de ambos extractos 2 gotas del reactivo Hager
- Se esperó unos minutos para ver la reacción química
- Para esta prueba se consideró positiva la aparición de alcaloides forma precipitados de color amarillo.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 5- Borntrager para quinonas

- ❖ Se llevaron a sequedad a través de baño maría 5ml de cada extracto y se agregaron 20 gotas de NaOH 10%. 20 gotas de tolieno.
- ❖ Se esperó unos minutos para ver la reacción química
- ❖ Para esta prueba se consideró si se observó una coloración roja en la fase acuosa.
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 6-Anticianidina para Anticianidina

- ❖ Se agregaron a 5ml de cada extracto 10 gotas del reactivo HCl 2N en 1- propanol,
- ❖ Se mezcla y calienta a baño maría por 10 minutos
- ❖ Para esta prueba se consideró positiva si se observó un color rojo intenso o rosado débil
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 7- Liebermann-Burchard para Tripenos y esteroides

- ❖ Se llevaron a sequedad a través de baño maría 5ml de cada extracto y se agregaron 10 gotas de anhídrido acético, 20 gotas de ácido acético y 1 gota de gota de ácido sulfúrico
- ❖ Se esperó unos minutos para ver la reacción química
- ❖ Para esta prueba se consideró positiva para esteroides si aparece una coloración azul verdoso y color rojo, rosado o púrpura para triterpenos.
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 8- Catequinas para Catequinas

- ❖ Se extrajeron 2 gotas de cada tubo de ambos extractos y se colocaron en papel filtro
- ❖ Se dejó secar por unos minutos para posteriormente colocarle 2 gotas Na_2CO_3
- ❖ Se esperó unos minutos y se llevó a los rayos UV
- ❖ Para esta prueba se consideró positiva si aparece una fluorescencia al someterse a los rayos UV
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Tubo N° 9-Baljet para Lactonas

- ❖ Se agregaron los tubos N° 9 de ambos extractos gotas del reactivo baljet A y baljetB
- ❖ Se esperó unos minutos para ver la reacción química
- ❖ Para esta prueba se consideró positiva la aparición de un complejo coloreado marrón.
- ❖ Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

4.4.5. De la obtención de *Streptococcus mutans*

Se siguió el protocolo brindado por la ATCC con algunas modificaciones.

Las cepas de *S. mutans* ATCC 250175 fueron obtenidas directamente de la ATCC y se encontraron a una temperatura de -80°C y se reactivaron al colocarse en una temperatura de 37°C

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

- Se preparó BHA, fue repartido en 12 placas Petri, se dejó solidificar para luego ser sembradas con la dilución anterior. Se realizaron los pozos con un sacabocado, y se agregó 100 mμ de cada propóleo, la prueba se hizo por duplicado.
- Se consideró también etanol de 96° como control negativo y digluconato de clorhexidina como control positivo.
- Se incubó por 24 horas a 37°C en microanaerofilia, luego se hizo las medidas de los halos de inhibición.
- Al finalizar la ejecución del proyecto las cepas de *S. mutans ATCC 25175*, fueron auto clavadas a 120° C por 20 minutos para luego ser desechadas

4.4.6. Del análisis de los resultados

Se comparó los extractos de propóleo en el cuál se observó quien mostró 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, y a través de gráfico de cajas.
- La marcha fitoquímica de los extractos de propóleo recolectados en verano y otoño fueron comparadas de manera descriptiva.
- El efecto antibacteriano de los extracto etanólicos de propóleo de Santiago de Chuco fue evaluado comparándolo con los controles positivo (+) o negativo (-), empleando el ANOVA y complementándolo con la prueba de Dunnett.
- Finalmente se comparó el efecto de los extractos etanolicos de propóleo de las dos estaciones entre sí, empleando la prueba T-student.
- La significancia fue considerada si $p < 0.05$

4.6. Matriz de consistencia

Problema	Objetivos	Hipótesis	Metodología	Población
¿Existe diferencia en el efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i>	<p>Objetivo general:</p> <p>Comparar el efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>Evaluar el efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en la estación de verano sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).</p> <p>Evaluar el efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en la estación de otoño sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).</p>	Si existe diferencia en el efecto del extracto etanólico de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).	<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>La población estuvo constituido por colonias de <i>S. mutans</i> (ATCC 25175).</p> <p>Muestra:</p> <p>La muestra fue dada por el estadístico y fue 6 repeticiones por grupo.</p>

<p>(ATCC 25175).?</p>	<p>Comparar el efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estación de verano y otoño; y etanol 96% sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).</p> <p>Comparar el efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estación de verano y otoño; y digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).</p> <p>Comparar la marcha fitoquímica de los extractos etanólicos de propóleo de Santiago de Chuco recolectado en verano y otoño.</p>		<p>Diseño de la investigación</p> <p>Experimental, prospectivo, transversal, analítico.</p>	
-----------------------	---	--	--	--

4.7. Principios Éticos

El presente estudio de investigación es un estudio in vitro que se realizó en cepas de *S. mutans ATCC 25175*, por lo mismo se solicitó la exclusión de ser evaluado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote.

V. RESULTADOS

1. Resultados

Tabla 1

Comparación in vitro del efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño sobre el crecimiento de Streptococcus mutans ATCC 25175

	Halo de inhibición (mm)	
	Verano	Otoño
Media	18.15	26.4
D. E.	1.80	2.58
Prueba T-Student	6.427	
Sig. (p)	0.000	

Fuente: Datos proporcionados por el autor.

En la comparación de los extractos en diferentes estaciones, se obtuvo para la estación verano una media de 18.15 y para la estación de otoño una media de 26.4, y usando la prueba estadística T-student para la comparación se obtuvo un valor de 6.427, con una significancia de $0.000 < (0.05)$, lo cual indica que existe una diferencia significativa entre las variables evaluadas.

Tabla 2

Comparación in vitro del efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estacione de verano y otoño frente al etanol 96% sobre el crecimiento de Streptococcus mutans ATCC 25175

	Halo de inhibición (mm)		
	Verano	Otoño	Control – (etanol 96°)
Media	18.2	26.4	0.0
DE	1.8	2.6	0.0
ANOVA: F		332.09	
P		0.000	
Dunnett	a	a	b

Fuente: Datos proporcionados por el autor

El halo de inhibición del extracto recolectado en Verano fue de 18.2 ± 1.8 mm y del extracto recolectado en Otoño de 26.4 ± 2.6 mm, no desarrollándose ningún efecto en el control – (etanol 96°), encontrándose diferencia entre ellos a través del ANOVA ($p=0.000 < 0.05$), pero el test de Dunnett indican un efecto superior de ambos extractos en comparación con el control-(etanol 96°).

Tabla 3

Comparación in vitro del efecto de los extractos etanólicos de propóleo recolectado en Santiago de Chuco en las estaciones de verano y otoño frente digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de Streptococcus mutans ATCC 25175

	Halo de inhibición (mm)		
	Verano	Otoño	Control + (Diluconato de clorhexidina 0,012%)
Media	18.2	26.4	13.0
DE	1.8	2.6	0.0
ANOVA: F		83.18	
P		0.000	
Dunnett	a	a	b

Fuente: Datos proporcionados por el autor

El halo de inhibición del extracto recolectado en Verano fue de 18.2 ± 1.8 mm y del extracto recolectado en Otoño de 26.4 ± 2.6 mm, frente a 13 mm en el control + (gluconato de clorhexidina), encontrándose diferencia entre ellos a través del ANOVA ($p=0.000 < 0.05$), asimismo el test de Dunnett indican un efecto superior de ambos extractos en comparación con el control + (gluconato de clorhexidina).

Tabla 4

Comparación la marcha fitoquímica de los extracto etanólicos de propóleo de Santiago de Chuco recolectado en verano y otoño.

Metabolitos	Ensayos	Verano	Otoño
Fenoles	FeCl ₃	+	++
Flavonoides	Shinoda	+	+++
Saponinas	Espuma	-	-
Alcaloides	Dragonforth	-	-
Quinonas	Borntrager	+	+++
Anticianidina	Antocianidina	-	+
Triterpenos y esteroides	Lieberman	-	-
	Buchard		
Catequinas	Catequinas	+	++
Lactonas	Baljet	+	++
Ausencia (-)	Poca (+)	Moderada (++)	Alta (+++)

Fuente: Datos proporcionados por el autor

La marcha fitoquímica de los extractos Verano y Otoño no presentan los metabolitos saponinas, alcaloides, triterpenos y estroides (-), en anticianidina sólo presentó el extracto de Otoño (+). Los fenoles, catequinas y lactonas presentaron mayor presencia en Otoño (+ frente a ++), presentando una mayor diferencia en flavonoides y quinonas (+ frente a +++).

2. Análisis de resultados

Giralt³⁴ indicó que es en la estación de otoño donde había mayor actividad biológica de los propóleos debido a que es época de lluvia lo cual genera una varianza de fuentes vegetales, asimismo evita la aparición de plagas en la flora y el aumento de la misma, lo que va a lograr una modificación positiva en la composición química. Además por la temperatura baja va a favorecer la transportación de las ceras hacia la colmena; esto concuerda con esta investigación donde el extracto recolectado en otoño mostró un mayor efecto antibacteriano. Lo anteriormente mencionado coincide también con lo dicho por Samara et. al.⁶ quien observó el efecto antibacteriano del propóleo en temperaturas bajas como 23° C y 14 °C; sin embargo en esta ocasión fue la de mayor temperatura (23° C) la que mostró un mayor efecto, lo que posiblemente nos indicaría que no se requiere temperaturas extremadamente bajas para obtener un efecto antibacteriano adecuado.

Otro punto dicho por Giralt³⁴ es que en otoño hay mayor producción de propóleo lo que también significa una mayor concentración de metabolitos como polifenoles y flavonoides que dan el efecto antimicrobiano. Esto coincide con el estudio hecho por Veloz et. al.⁵ estudió si el año de recolección influye en su actividad frente a *S. mutans* para lo que tomaron muestras de propóleos de una misma estación en los años 2008, 2010 y 2011, sus resultados mostraron una mayor concentración de polifenoles totales, flovonas y flovonoles para el año 2010, por otro lado si bien no se observó una diferencia significativa en la inhibición de *S. mutans* si hubo diferencia al inhibir la formación de la biopelícula a favor del propóleo recolectado en el 2010, lo que muestra que al haber 1 año de diferencia entre las muestras permitió que haya una mayor cantidad de muestra para el año 2010 y por consecuencia una mayor concentración de

metabolitos, esto se asemeja a lo encontrado en este estudio ya que la mayor cantidad de propóleo fue encontrado en la estación de Otoño, sin embargo también contradice con lo referido por Manrique y Egea³³ quienes indican que hay una mayor producción de propóleo en verano sobre otoño ya que en esta estación hay una preferencia en la recolección por las abejas debido a que es un clima cálido que va a favorecer el crecimiento de las especies vegetales.

Por otro lado los resultados mostraron un resultado favorable para ambos propóleos obtenidos de Santiago de Chuco, al momento de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, el extracto al 5% recolectado en Verano presentó un halo de 18.2 ± 1.8 mm y el extracto al 5% recolectado en Otoño un halo de 26.4 ± 2.6 mm. Sin embargo el estudio de Jara⁷ obtuvo un mejor resultado con su extracto recolectado en Oxapampa presentando un halo de 33.15 mm frente a *S. mutans* mostrando que posiblemente la ubicación puede variar los resultados al igual que la concentración utilizada tal y como lo muestra Huayhua⁸ et. al. que al comparar sus extractos de propóleo mostraron un mayor efecto antimicrobiano a mayor concentración al igual que Ramirez et. al.⁹ pero Eguizábal et. al.¹⁰ nos mostró todo lo contrario ya que en su estudio este obtuvo como resultado que ha menor concentración de propóleo mayor efecto antibacteriano, lo que podría reflejar la relación entre concentración y lugar de recolección ya que la efectividad de la concentración posiblemente depende también del lugar donde se recolecta el propóleo.

Asimismo en este estudio se comparó el efecto antibacteriano de los extractos de propóleo recolectados en las estaciones de Verano y Otoño con digluconato de clorhexidina al 0.12% mostrando un mejor resultado para ambos extractos dado a que digluconato de clorhexidina 0.12% mostró un halo de tan solo 13 ± 1.3 mm esto

coincide con los estudios de Eguizábal et. al. ¹⁰ y Veloz et. al.⁵ quienes al comparar sus respectivos extractos de propóleo con digluconato de clorhexidina también presentaron un resultado superior demostrando que los componentes del propóleo pueden ser mejores que los del digluconato de clorhexidina 0.12%.

De igual manera este estudio evaluó la presencia de metabolitos a través de reactivos de coloración y precipitación según el método de Olga Lock, obteniendo como resultado la presencia de fenoles, flavonoides, quinonas, catequinas y lactonas para los extractos de ambas estaciones pero con mayor intensidad para el extracto de Otoño; sin embargo la presencia de los metabolitos flavonoides y quinonas obtuvo un resultado más diferenciado en cuanto a concentración de estos metabolitos a favor del extracto recolectado en Otoño quien también mostró ser el único en obtener Antocianidina mostrando que el clima influye en la concentración de metabolitos ya que estos dependen de la flora circundante siendo esta su variedad dependiente del cambio climático, la temperatura, humedad, tipo de suelo y la ubicación como lo demostró Soto¹¹ en su estudio para determinar los metabolitos de extractos etanólicos de tres propóleos peruanos donde sus resultados mostraron 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 y taninos y flavonoides que si bien estuvieron presentes en los tres extractos se presentaron en mayor intensidad para Ayacucho, seguido por Piura y en menor intensidad para Pucallpa; sin embargo la presencia de quinonas fue solo en extracto de Ayacucho; saponinas en Pucallpa y alcaloides para Piura.

VI. CONCLUSIÓN

- El extracto etanólico de propóleo recolectado en otoño presentó mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación con el extracto etanólico de propóleo recolectado en verano.
- Los extractos etanólicos de propóleo recolectados en verano y otoño presentaron efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación al etano de 96° que no obtuvo ningún efecto.
- Los extractos etanólicos de propóleos recolectados en verano y otoño presentaron mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en comparación con el digluconato de clorhexidina al 0.12%.
- El extracto etanólico de propóleo recolectado en otoño presentó mayor concentración de metabolitos en comparación con el propóleo recolectado en verano.

Recomendaciones

- El año en que se realizó el estudio se sufrió de un fenómeno climático llamado el niño costero, lo cual pudo haber influido en los resultados del estudio por lo cual se recomienda seguir realizando estudios con las mismas variables.
- Asimismo este estudio solo evaluó las estaciones de verano y otoño, lo cual se recomienda realizar un estudio en las cuatro estaciones a la vez

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. 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
2. 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
3. Niedzielska I, Puszczewicz Z, Mertas A, Niedzielski D, Rózanowski B, Baron S. The Influence of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis Gel on Hygiene and Oral Microbiota in Patients after Mandible Fractures. *Biomed Res Int*. 2016; 2016
4. Pellati F, Prencipe F, Bertelli D, Benvenuti S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013; 81–82: 126–132.
5. Veloz J, Saavedra N, Lillo A, Alvear M, Barrientos L, Salazar L. Antibiofilm Activity of Chilean Propolis on *Streptococcus mutans* Is Influenced by the Year of Collection. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 291-351.
6. Samara N, Benitez N, Cabezas F. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011; 9(1): 8 – 16.

7. Jara P. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de streptococcus mutans (ATCC 25175) y streptococcus sanguinis (ATCC 10556) Lima, Perú 2014
8. 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)
9. 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
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. Morsya A, Soltan Y, Sallam S, Kreuzerc M, Alencard S. Abdallae Comparison of the in vitro efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origin in enhancing the ruminal degradability of organic matter and mitigating the formation of methane. Animal Feed Science and Technology. 2015; 199: 51-60
13. 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

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Peña, R. . Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación agraria*, 2008; 35: 17-26.
18. 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.
19. Vijay D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv Pharmacol Sci.* 2013; 2013
20. 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.
21. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 2011 Jan 27;133(2):253-60

22. 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.
23. Martínez J. Caracterización físico-química y evaluación de la actividad anti fúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. [tesis de maestría]. Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad nacional de Colombia sede Medellín; 2009.
24. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011 Jan 27;133(2):253-60.
25. Silvaa J, Rodriguesa S, Feásc X, Estevinhoa M, Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 2012; 50(5) 1790–1795
26. Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Lourenço J, Costa A. Impact of Biohybrid Magnetite Nanoparticles and Moroccan Propolis on Adherence of Methicillin Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2016; 21(9)
27. Shuai H., Cui Z., Kai W., George Q. y Fu-Liang H. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*. 2014; 19: 19610-19632.
28. Fründ J, Zieger S, Tschardtke T. Response diversity of wild bees to overwintering temperatures. *Oecologia*. 2013 Dec;173(4):1639-48.
29. Ostrowski F, Prospero 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)

30. 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.
31. Graça M, Nunes S, Dandlen S, Cavaco A, Antunes D. Fenoles, flavonoides y la actividad antioxidante de los extractos acuosos y metanólicos de propóleos (*Apis mellifera* L.) de Algarve, sur de Portugal. *Ciencia y Tecnología de Alimentos (Campinas)*. 2014; 34(1)
32. Samara N, Benitez N, Cabezas F. Actividad Antibacteriana Y Composicion Cualitativa De Propoleos Provenientes De Dos Zonas Climaticas Del Departamento Del Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011; 9(1): 8 – 16
33. Manrique A y Egea Soares A. Relación entre la producción de propóleos y la tasa de infestación de varroas (*Varroa destructor*) en abejas africanizadas (*Apis mellifera*) en Brasil. *Zootecnia Trop*. 2004; 22(3): 289-298.
34. Giralt, T. Producción, Cosecha, Manejo poscosecha, Caracterización de propóleos y forma de empleo en la terapia de diferentes enfermedades. *Memorias IV Seminario Internacional de abeja africanizada Universidad Nacional de Colombia sede Medellín*. Agosto 2001. Pag. 25-38.
35. Asís, M. Apiterapia para todos. Como usar los siete productos de la colmena para curar. Ed. Científico Técnica. 1993. 60-96.
36. 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..

37. 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.
38. 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.
39. Popova M, Chinou I, Marekov I, Bankova V. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry.* 2009; 70(10):1262-71.
40. 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.
41. 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.
42. Bankova V, De Castro S, Marcucci C. "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*, 2000; 31(1): 3–15.
43. Rengifo R. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Revista Farmaciencia* Diciembre 2013; 1(2).
44. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules.* 2014; 19(12):19610-32
45. Alvarez S. Organoleptic characterization and physical-chemistry of propolis of the department of la libertad, peru. *The Biologist*, 2012, 10(1), jan-jun:34-40.

46. Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.*, 2001, 15 (7), 561-571.
47. 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
48. 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.
49. 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.
50. Gibbons R, Houte J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Annual Review of Microbiology.* 1975; 29, 19–44.
51. Hamada, S., Slade H. Biology, immunology, and cariogenicity of *S. mutans*. *Microbiological Reviews.* 1980; 44, 331–384.
52. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res.* 1991; 25(5):347-51.
53. Park Y, Ikegaki M, Alencar S. Classification of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Mensagem Doce*, 2000 58, 2-7.
54. 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.

55. Quintero J, Váquiro H, Solanilla J, Murillo E, Méndez J. In Vitro Fungistatic Activity Of Ethanolic Extract Of Propolis Against Postharvest Phytopathogenic Fungi: Preliminary Assessment. *Acta Hortic.* 2011; 1016: 157-162
56. 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.
57. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos de Estudio de Productos Vegetales. 2da ed. Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. 1988. p.1-8.17. Cabre

ANEXO 01:

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

<u>Tiempo de recolección del extracto:</u>	
A ()	B ()
<u>Halo de inhibición (mm):</u>	
Pozo 1 ()	Pozo 2 ()
.....mm	

ANEXO 02:

CONSTANCIAS DE ASESORAMIENTO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Trujillo, 20 de mayo del 2017

CONSTANCIA DE ASESORÍA

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

Dejo constancia de haber asesorado a la alumna **THALIA BACA BECERRA** en las actividades de recolección del producto, preparación de la muestra, preparación del extracto etanólico y preparación de las concentraciones de ensayo, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de La Universidad Nacional de Trujillo. Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas, serán utilizadas para el desarrollo de la tesis titulada **“COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE PROPOLEO RECOLECTADO EN SANTIAGO DE CHUCO EN LAS ESTACIONES DE VERANO Y OTOÑO SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175)”**

Atentamente,



Dra. **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**

Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

Laboratorio de Farmacognosia

Universidad Nacional de Trujillo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trujillo, 20 de mayo del 2017

CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo, **JORGE LUIS DE ROSARIO CHAVARRI**, investigador asociado del laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Universidad Nacional de Trujillo.

Dejo constancia de haber asesorado a la alumna **THALIA BACA BECERRA** en las actividades microbiológicas tales como, activación de cepas, siembra de cultivos, enfrentamiento microbiológico y tomas de medidas de los halos de inhibición, en el laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de La Universidad Nacional de Trujillo para el desarrollo de la tesis titulada “**COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS DE PROPOLEO RECOLECTADO EN SANTIAGO DE CHUCO EN LAS ESTACIONES DE VERANO Y OTOÑO SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175)**”

Atentamente,

Blgo. **JORGE LUIS DEL ROSARIO CHAVARRI**

Investigador asociado a la Facultad de Ciencias Biológicas

Laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética

Universidad Nacional de Trujillo

ANEXO 03:

GRÁFICO 01

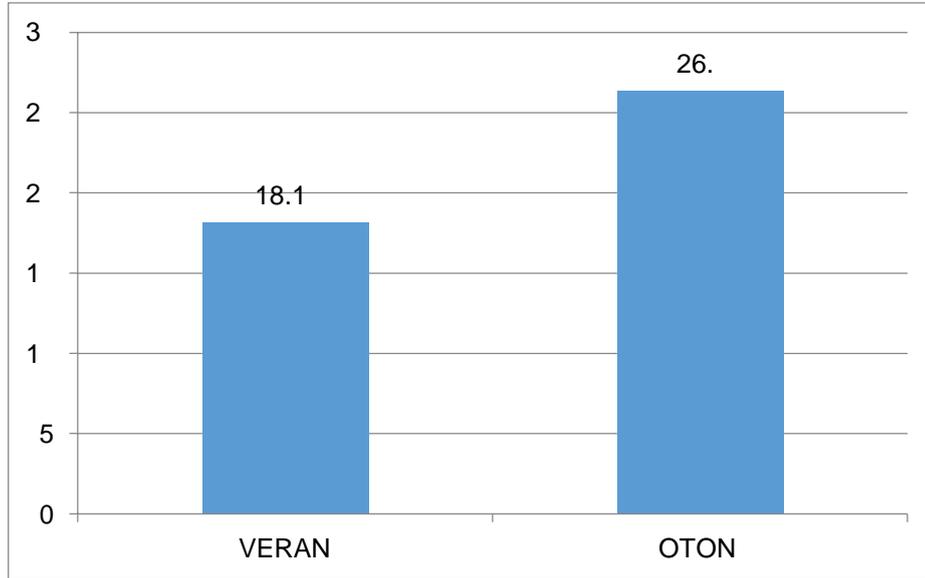


GRÁFICO 02

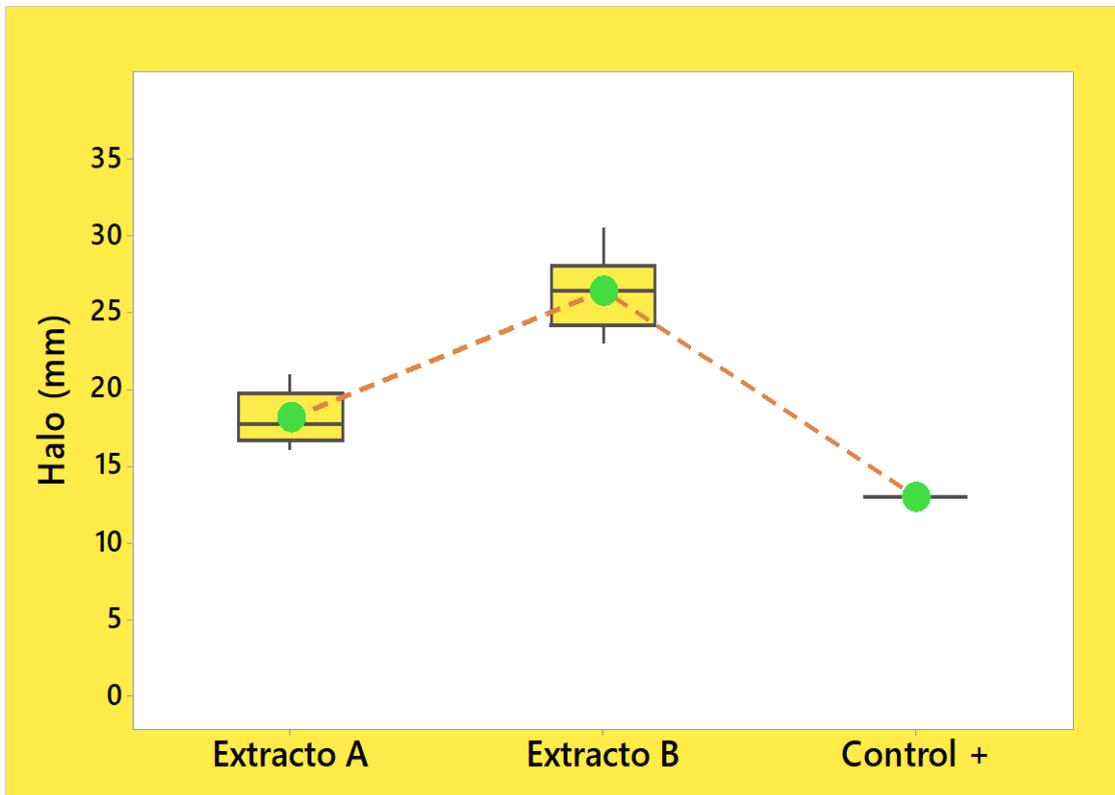
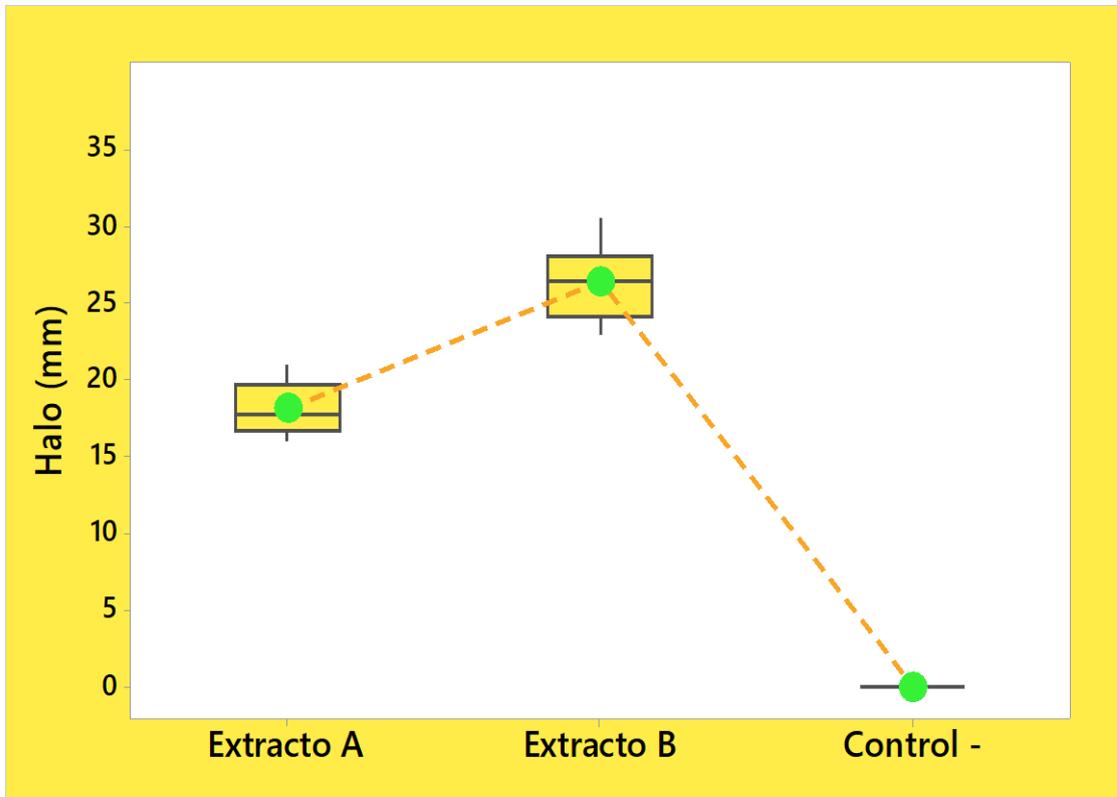
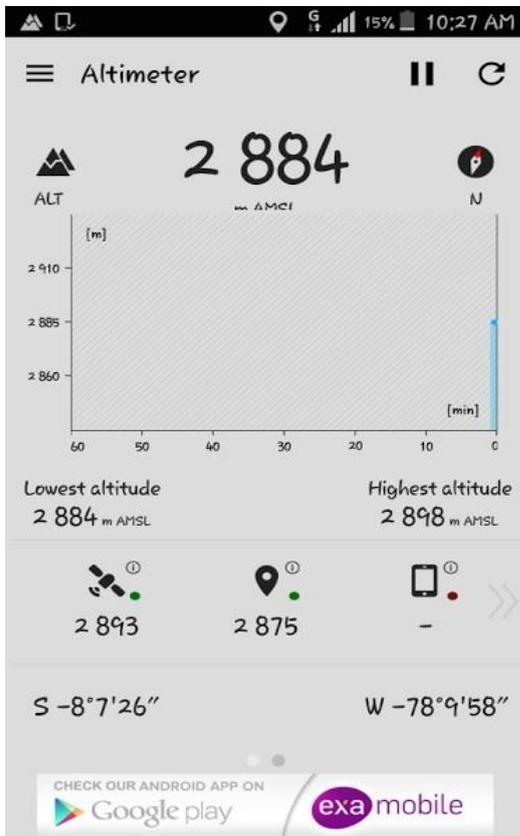


GRÁFICO 03



ANEXO 04:
FOTOS DE LA EJECUCIÓN:



Las muestras de propóleos recolectadas
a 2 884 msnm

Muestras de propóleos
recolectadas con una espátula plástica



Muestras de propóleos puestos en un recipiente
de vidrio con tapa hermética



Muestras de propóleos forradas
con bolsa negra de polietileno



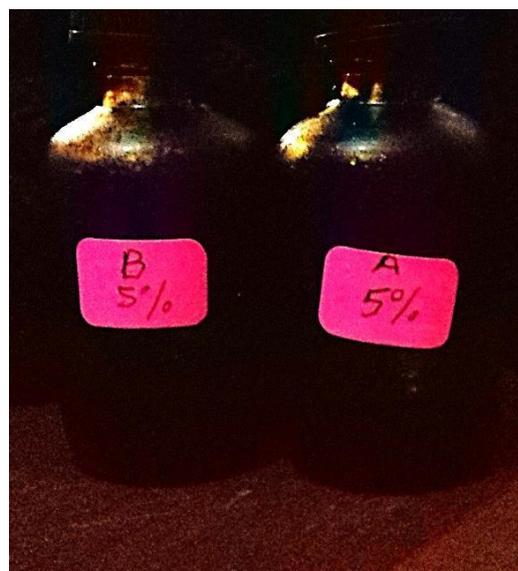
Peso de las muestras de propóleos en una proporción 10gr en 100 ml



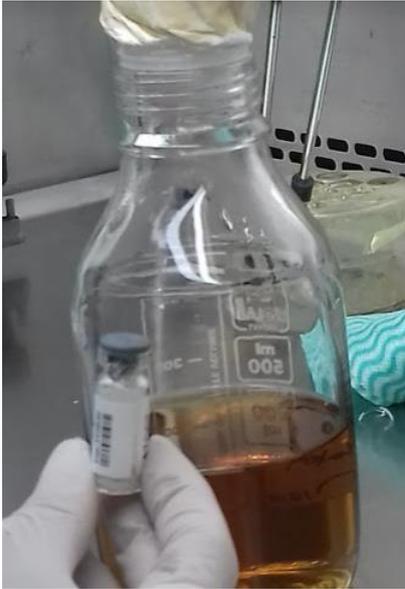
Maceración de las muestra con etanol al 96°



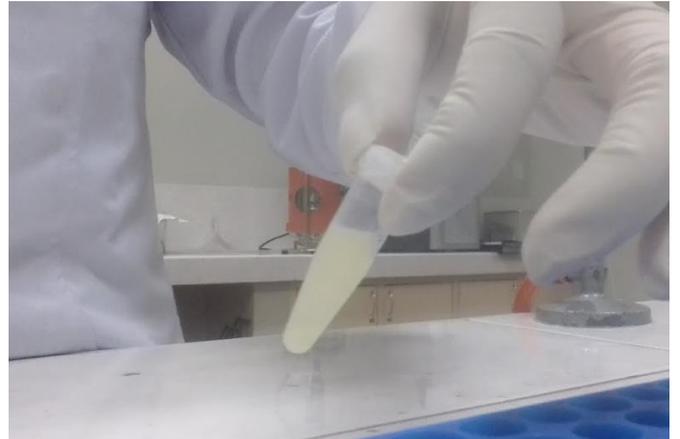
Filtración al vacío de ambas muestras



Concentración de las muestras al 5% guiados por su máxima solubilidad



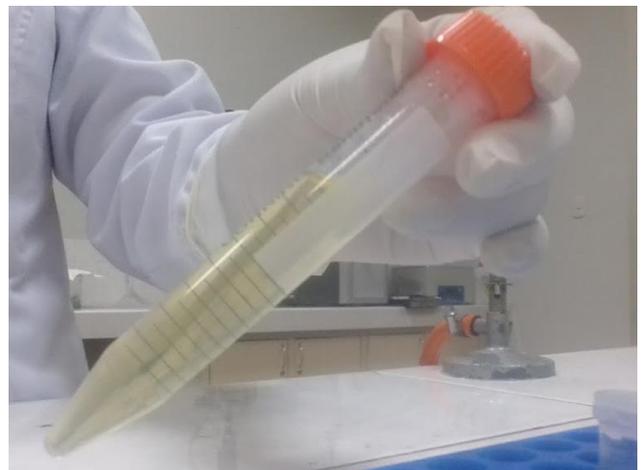
Cepas de *S* mutans ATCC 25175
activándose en BHI



Conservación de las cepas de *S* mutans
ATCC 25175 en leche y BHI + glicerina



Resembrado de las cepas de *S* mutans
ATCC 25175



S. mutans con densidad óptica de
0.270



Preparación de BHA



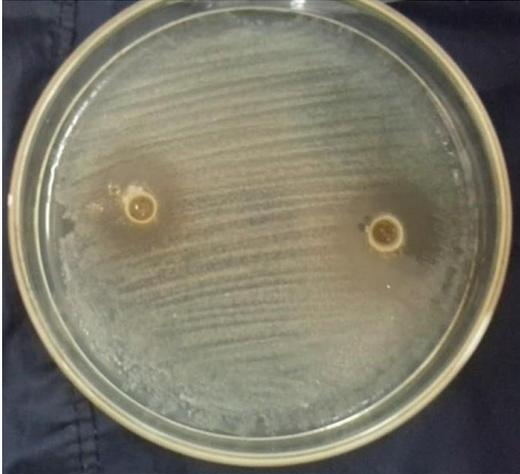
Vaciado de BHA en placas Petri



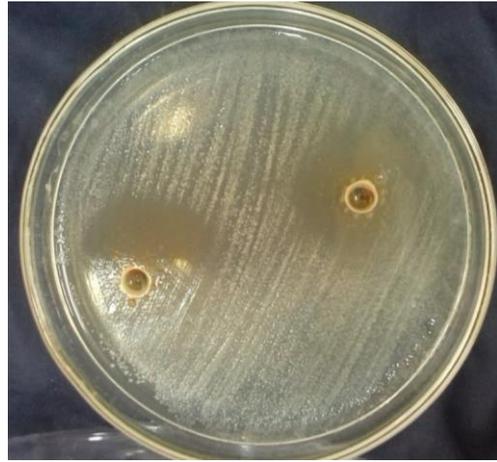
Sembrado de S mutans en BHA



Colocación de 100 μ l de los
extractos en los pozos hechos en
las placas petri



Halos de inhibición extracto verano



Halos de inhibición extracto otoño