

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA



“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
PROPÓLEO SOBRE EL *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175) IN VITRO,
TACNA 2020”

Presentado por:

Bach. Jackeline Luciana Checalla Collatupa

Asesor: Mag.C.D. Esp. Marco Sánchez Tito

Tesis para Optar el Título Profesional de:

Cirujano Dentista

Tacna – 2020

DEDICATORIA

A mi madre por su infinito amor y protección, definitivamente soy muy afortunada de tenerte como madre, compañera incondicional durante todo este camino, por haberme ayudado de manera constante durante estos años, sin ti nada de esto hubiese sido posible.

A mi padre por tener siempre la confianza en que lograría salir adelante, gracias a ti aprendí que los retos se podían superar, gracias por el apoyo y los consejos brindados.

A mí querida hermana por su apoyo incondicional, que con sus palabras de aliento y sonrisas me motivaron a seguir y lograr mi objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por cuidarme durante todo mi camino y darme todas las fuerzas para poder superar cada prueba.

A mis padres Percy y Deysi por ser el pilar más importante en mi vida y darme la oportunidad de lograr mis objetivos.

A mi Asesor Mag. C.D. Esp. Marco Sánchez Tito por su valiosa asesoría y consejos brindados en la realización del presente trabajo.

A mi querido José María por sus palabras de confianza, por su amor y apoyarme desde el principio para poder llegar a la meta.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	02
AGRADECIMIENTOS.....	03
RESUMEN.....	07
ABSTRACT.....	09
INTRODUCCIÓN.....	11
CAPÍTULO I EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	13
1.1 FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA.....	13
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
1.4 JUSTIFICACIÓN	16
CAPÍTULO II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	19
2.2 MARCO TEÓRICO	24
2.2.1 BASES CIENTÍFICAS	24
2.2.1.1 Caries.....	24
A. Huésped	25
a. Diente	25
b. Saliva.....	27
c. Inmunización.....	29
B. Microflora.....	29
a. Colonización bacteriana.....	29
b. Factores de virulencia	30
c. Factores de tiempo en el desarrollo de la caries.....	31
C. Sustrato.....	32

2.2.1.2	Distribución de los microorganismos en la cavidad oral.....	33
2.2.1.3	Streptococcus mutans.....	34
2.2.1.4	Propóleo.....	35
2.2.1.4.1	Etimología.....	35
2.2.1.4.2	Definición.....	35
2.2.1.4.3	Características.....	36
2.2.1.4.4	Propiedades terapéuticas.....	36
2.2.1.4.5	Usos del propóleo en odontología.....	37
2.2.1.5	Gluconato de clorhexidina.....	39
2.2.1.5.1	Definición.....	39
2.2.1.5.2	Concentración.....	39
2.2.1.5.3	Usos en odontología.....	39
CAPÍTULO III	HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES	
OPERACIONALES.....		41
3.1	Hipótesis	41
3.2	Operacionalización de las variables	41
CAPÍTULO IV	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	42
4.1	Diseño de la investigación.....	42
4.2	Tipo de investigación.....	42
4.3	Ámbito de estudio.....	43
4.4	Población y muestra.....	43
4.4.1	Criterios de inclusión.....	43
4.4.2	Criterios de exclusión.....	44
4.5	Instrumentos de recolección de datos.....	44
4.5.1	Coordinación	44
4.5.2	Técnicas de recolección de los datos.....	44
4.5.3	Ficha de recolección de datos.....	45
4.5.4	Instrumentos.....	45
4.5.4.1	Equipos.....	45
4.5.4.2	Material de vidrio.....	46

4.5.4.3	Medios de cultivo, bacteria y reactivos.....	47
4.5.4.4	Otros.....	48
CAPÍTULO V PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....		49
5.1	Recolección de la muestra.....	49
5.1.1	Recolección del propóleo.....	49
5.1.2	Procesamiento del extracto etanólico de propóleo.....	49
5.1.3	Obtención de las diferentes concentraciones del extracto.....	50
5.2	Obtención de las cepas en estudio – <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	51
5.3	Evaluación de los agentes antibacterianos.....	51
5.3.1	Preparación del inóculo Bacteriano de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	51
5.3.2	Preparación de los discos.....	52
5.3.3	Dispensación de los discos a las placas inoculadas...	53
5.3.4	Lectura.....	53
5.4	Cromatografía.....	54
CAPÍTULO VI RESULTADOS		56
CAPÍTULO VII DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....		71
ANEXOS.....		77

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) frente a *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) ATCC 25175, mediante un estudio in vitro, en 2020. **Material y método:** El diseño fue de tipo experimental utilizando un instrumento exclusivo para la investigación donde se aplicó EEP frente a *S. mutans* ATCC 25175. El EEP se obtuvo por maceración en alcohol al 70% durante 19 días, este EEP fue diluido con alcohol para obtener concentraciones de 25%, 50% y 75%. El EEP fue sometido a cromatografía en capa fina para identificar sus componentes químicos. Se utilizó la prueba de difusión en disco sobre el medio Brain Heart Infusion Agar (BHA) inoculado con *S. mutans* ATCC 25175, empleándose como control positivo la clorhexidina (CHX) al 0,12%. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Finalmente se utilizó el compás Vernier para realizar la medición de los halos de inhibición. **Resultados:** Los resultados mostraron que el EEP presenta como principales componentes terpenos, di-terpenos y terpenoidales. Se demostró el efecto antibacteriano frente al *S. mutans* ATCC 25175, todas las concentraciones del EEP presentaron efecto antibacteriano frente al *S. mutans* (25% = 17.5831 ± 2.5773 mm; 50% = 16.9050 ± 1,8918 mm; 75% = 16,8813 ± 2,0137 mm); sin embargo estos resultados fueron menores al ser comparados con CHX al 0,12% (24,5438 ± 2,4869 mm) ($p < 0,05$). Según la escala de Duraffourd y Lapraz que considera el efecto antibacteriano frente a *S. mutans* ATCC 25175 según sus halos de crecimiento para el EEP al 25% fue muy sensible (++) , para el EEP al 50% fue muy sensible (++) y para el EEP al 75% fue muy sensible (++) , mientras que para CHX al 0,12% fue sumamente sensible (+++) ($p < 0,05$). **Conclusiones:** Se logró determinar el efecto antibacteriano con las diversas concentraciones de EEP peruano

obteniéndose valores favorables como muy sensible frente al *S. mutans* ATCC 25175.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, Extracto etanólico de Propóleo, *Streptococcus mutans*

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antibacterial effect of Ethanolic Propolis Extract (EEP) against *Streptococcus mutans*. (*S. mutans*) ATCC 25175, through an in vitro study, in 2020. **Material and method:** The design was experimental, using an exclusive instrument for research where EEP was applied against *S. mutans* ATCC 25175. EEP was obtained by maceration in 70% alcohol for 19 days; this EEP was diluted with alcohol to obtain concentrations of 25%, 50% and 75%. EEP was subjected to thin layer chromatography to identify its chemical components. The disk diffusion test was used on Brain Heart Infusion Agar (BHA) medium inoculated with *S. mutans* ATCC 25175, using 0.12% chlorhexidine (CHX) as a positive control. Plates were incubated for 48 hours at 37 °C under microaerophilic conditions. Finally, the Vernier compass was used to measure the inhibition halos. **Results:** The results showed that EEP presents terpenes, di-terpenes and terpenoids as main components. The antibacterial effect against *S. mutans* ATCC 25175 was demonstrated, all concentrations of EEP showed antibacterial effect against *S. mutans* (25% = 17.5831 ± 2.5773 mm; 50% = 16.9050 ± 1.8918 mm; 75% = $16, 8813 \pm 2.0137$ mm); however, these results were lower when compared to 0.12% CHX (24.5438 ± 2.4869 mm) ($p < 0.05$). According to the Duraffourd and Lapraz scale that considers the antibacterial effect against *S. mutans* ATCC 25175 according to their growth halos, for the 25% EEP it was very sensitive (++) , for the 50% EEP it was very sensitive (++) and for EEP at 75% it was highly sensitive (++) , while for CHX at 0.12% it was highly sensitive (+++) ($p < 0.05$). **Conclusion:** The antibacterial effect was

determined with the various concentrations of Peruvian EEP, obtaining favorable values as very sensitive against *S. mutans* ATCC 25175.

Keywords: Antibacterial effect, Ethanolic extract of Propolis, *Streptococcus mutans*

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad multifactorial, que corresponde a una alteración que existe entre el equilibrio y proporción entre las diversas especies de microorganismos de la flora oral y factores relacionados a la ingesta de alimentos con altos contenidos de azúcar y carbohidratos.

El ***Streptococcus mutans*** es el principal agente bacteriano en la génesis de la caries dental, se trata de un coco Gram positivo que carece de catalasa y es un anaerobio facultativo. Frente a dietas altas en carbohidratos el ***S. mutans*** produce ácidos orgánicos como resultado del metabolismo del azúcar, estos ácidos son responsables de remover el mineral de la pieza dentaria y posteriormente generar lesiones cavitadas.

Para la prevención de la caries dental existen diversas estrategias empleadas como una correcta higiene bucal, el uso de productos que contienen xilitol que ayuda a contrarrestar el crecimiento bacteriano, uso de flúor o consumo de agua fluorada, reducir el consumo de alimentos azucarados o con carbohidratos y también el uso de colutorios antibacterianos como la clorhexidina, que es de amplio espectro siendo un antimicrobiano catiónico, su acción se realiza mediante la disminución de la formación de la película adquirida y la adhesión microbiana a la superficie dental.

Frente a la búsqueda de nuevas propuestas de carácter preventivo o de tratamiento, diversas investigaciones han propuesto el uso de agentes naturales con el objetivo de comprobar su efectividad frente al ***S. mutans*** u otras bacterias precursoras de la caries.

El Perú es un país biodiverso donde existe una gran variedad de recursos naturales, dentro de ellos se destaca el propóleo, que es una sustancia resinosa procesada por las abejas "*Apis Mellifera*", obtenida de los brotes de plantas, flores, arbustos y que es empleada para cerrar grietas, evitar las corrientes de aire, reducir las vías de acceso de entrada a insectos, momificar organismos vivos que se introducen en la colmena como por ejemplo gusano de cera, hormigas, mariposas, reptiles.

El propóleo ha sido ampliamente empleado en el área de la salud, como anestésico local, bactericida, bacteriostático, tratamiento de enfermedades respiratorias y acción dermatológica. En el campo de la odontología el propóleo también ha sido empleado como bacteriostático, antimicrobiano, antifúngico, anestésico y cicatrizante.

Los estudios realizados en Perú para conocer el efecto del propóleo frente al ***S. mutans*** lo han empleado como extracto etanólico del propóleo sin embargo no se ha realizado la caracterización química de sus componentes, lo cual resultaría importante para poder identificar las propiedades inherentes a esta sustancia proveniente de regiones en las cuales el propóleo es obtenido, esto considerando que el Perú presenta una alta diversidad en flora lo que pudiera afectar la efectividad del producto.

Es por este motivo que el presente trabajo de investigación pretende evaluar el efecto antibacteriano de estos recursos naturales como el propóleo sobre cepas de ***S. mutans*** ATCC 25175.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 FUNDAMENTACIÓN DEL PROBLEMA

Actualmente se denomina caries dental a una disbiosis, esta se refiere a la alteración que existe entre la proporción de las diversas especies de microorganismos de la flora oral y su equilibrio, esta se logra evidenciar principalmente por el alto consumo de azúcares (1). Se produce por factores que implica de tal manera a los dientes, saliva y los microorganismos como factores individuales y la dieta como un factor externo.

Existen bacterias que están presentes dentro de la cavidad oral cuya principal es el ***Streptococcus mutans***, este se encargará de metabolizar el azúcar, cuya patogenicidad va a depender de sus propiedades individuales o de su manera de interactuar con el biofilm dental (2).

El ***S. mutans*** tiene un papel principal en esta enfermedad dental transmisible la cual es la caries dental. En la mayoría de las enfermedades infecciosas se necesita la colonización de un patógeno previamente a una infección. Estudiar los factores de virulencia de la correlación que existe entre el ***S. mutans*** y la biodiversidad de especies es esencial para lograr comprender como es que se realiza la colonización por los distintos genotipos en el mismo individuo y las

características que podrían o no influenciar en su habilidad para poder sobrevivir en diferentes condiciones ambientales y su capacidad de virulencia (3) (4).

Los principales microorganismos relacionados a las lesiones cariosas son los streptococcus con las subespecies ***Streptococcus mutans*** y streptococcus sobrinus, lactobacillus y actinomyce; de los cuales el principal es el ***S. mutans***, al acumularse sobre la superficie del esmalte va a producir ácidos el cual está vinculado mayormente con el inicio y desarrollo de lesiones cariosas (2) (3).

Ante lo anteriormente mencionado y frente a esta problemática numerosas investigaciones han explorado el efecto antibacteriano de algunos productos en especial de origen natural frente a principales agentes responsables de la caries dental y su formación, es decir el ***S. mutans*** (5) (6) (7). Cabe resaltar que existen estudios involucrados con la eliminación y destrucción de la caries dental asociados al uso del propóleo, teniendo como finalidad establecer la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos bucales (8) (9) (10).

Existe una característica muy importante del propóleo la cual es que presenta actividad antimicrobiana y propiedades bacteriostáticas, antifúngicas, anestésicas y cicatrizantes (11). El propóleo es de origen natural con una consistencia dura, quebradiza y gomosa con la presencia de un olor agradable dulce, este será originado de las yemas y cortezas tanto de árboles como arbustos, las cuales serán recogidas por las abejas (6) (7).

El propóleo es conocido desde la antigüedad y es utilizado con varios fines, con el gran avance de la farmacéutica y fitoterapia, se dio la reaparición de su uso de tal manera que en los últimos años se

realizaron ciertas investigaciones y estudios sobre aquellos productos originarios de las abejas y las ventajas que tienen para la salud oral, colaborando con la solución de un problema de salud pública el cual es la caries dental (7) (10).

Teniendo en cuenta que la calidad del Propóleo varía de acuerdo a la zona de producción (11) (12). Por otro lado, emplear propóleo de un modo habitual como una sustancia medicinal a través de la historia de la humanidad, permite anunciar su aprobación de manera como un producto farmacéutico (12) (13). La geografía y gran vegetación peruana se prestan para el desarrollo de la apicultura. Actualmente la producción de propóleo aún se realiza a pequeña escala, a través de su principal derivado que es la tintura de propóleo (Solución alcohólica de concentración desconocida).

Después de haber revisado algunas investigaciones científicas la medicina alternativa presenta a la Odontología, entre otros, al propóleo como solución a diversos problemas de salud oral (11). En las cuales han evidenciado que el extracto etanólico del propóleo presenta una gran capacidad antibacteriana frente al ***S. mutans*** es que se desea comparar dichas sustancias.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El extracto etanólico de propóleo tendrá mayor efecto antibacteriano que la clorhexidina al 0,12% frente al ***Streptococcus mutans*** (ATCC 25175) en un estudio in vitro Tacna 2020?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto antibacteriano del extracto etanólico propóleo sobre el ***Streptococcus mutans*** (ATCC 25175).

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de propóleo al 25%, 50% y 75% sobre ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175.
- Comparar el efecto antibacteriano in vitro de las distintas concentraciones del extracto etanólico de propóleo sobre el ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175 frente a la clorhexidina al 0,12%.

1.4 JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio es aportar con el conocimiento sobre la efectividad antibacteriana que presenta el propóleo para contrarrestar al ***Streptococcus mutans***.

Estando ante la necesidad de controlar y prevenir la caries dental, se han ido presentado numerosos métodos o tratamientos para de esta manera poder evitar la progresión, dolor y pérdida dental que existe en los pacientes.

El efecto antibacteriano de los productos de origen natural ayuda de gran manera en la salud bucodental, por lo cual se garantiza una buena salud y calidad de vida, la cual se entiende como la ausencia de enfermedades bucales y limitaciones en la capacidad de sonreír, morder, hablar y masticar; a su vez estas repercutirán en el bienestar psicosocial de la persona.

De esta manera, también el uso de productos naturales viene a ser una alternativa favorable en un tratamiento de caries dental ya que todos estos productos se encuentran accesibles en diversos puntos de venta y a su vez al tener efecto antibacteriano van a presentar efectividad en la eliminación de los orígenes de esta enfermedad.

El uso de productos naturales podría tener beneficios en un futuro puesto que surgirán diversas alternativas de tratamiento para dicha enfermedad, esto se debe a que algunas sustancias procesadas o no naturales al ser consumidas van presentando efectos secundarios y esto hace que se genere mayor demanda de sustancias naturales en el área de Odontología, sobretodo como medida de cuidado y prevención de la salud.

El presente trabajo es conveniente frente a esta problemática, ya que se investiga productos de origen natural que reduzcan la actividad bacteriana del ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175, en este caso el extracto etanólico de propóleo.

Finalmente se anhela lograr un aporte significativo en un aspecto teórico del área de Odontología lo cual impulsará la investigación de otras áreas científicas en este caso la fitoterapia y la apiterapia aplicadas a la odontología, con la finalidad de estudiar las plantas que poseen efecto medicinal.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Huaytalla M, cols. Efecto inhibitor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de Lactobacillus acidophilus. 2018 (14). Este estudio tuvo como objetivo demostrar mediante un estudio in vitro el efecto inhibitor del EEP y compararlo con la CHX frente a cepas de lactobacillus acidophilus. Este estudio se realizó mediante la conformación de cepas de lactobacillus acidophilus, utilizando 30 muestras de cultivos en placas Petri con agar sangre, se impregnó discos de papel Whatman N°40 con EEP al 15% y 30%, de la misma manera con el control positivo la clorhexidina 0,12%. El cultivo se fue desarrollando en condiciones de anaerobiosis a 37°C. Dando como resultado que es más efectivo el EEP al 30% que la CHX al 0,12% para lograr controlar la presencia de lactobacillus acidophilus.

Airen B, cols. Antibacterial effect of propolis derived from tribal region on Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus: An in vitro study. 2018 (15). Este estudio in vitro tuvo como objetivo investigar la actividad antimicrobiana del EEP y el EAP contra dos

patógenos cariogénicos orales principales como el *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*. Este estudio se inició recolectando el propóleo de las colmenas en una región de la India, posteriormente los extractos etanólicos se prepararon en dos concentraciones de 5% y 20% peso/volumen. Para poder respaldar los resultados obtenidos, se utilizó un control positivo (clorhexidina 0,2%) y un control negativo (agua destilada). El *Streptococcus mutans* se cultivó en agar de infusión cerebro-corazón y *Lactobacillus acidophilus* se cultivó en agar De Man, Rogosa y Sharpe. Este estudio dio como resultado que a concentraciones de 5% y 20%, el EEP fue efectiva contra el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. La actividad más alta se mostró con la clorhexidina al 0.2% concluyendo así que el propóleo obtenido de la región de la India sí posee efecto antibacteriano contra *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus mutans*.

Rueda M, cols. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra *Streptococcus mutans*. 2015 (16). Este estudio tuvo como objetivo comparar el efecto antibacteriano del EAP extraído de Ecuador frente a la CHX. Se realizó utilizando la cepa de *Streptococcus mutans*; este fue sembrado en placas Petri con agar sangre; impregnando discos de papel filtro con EAP ecuatoriano al 30%, 50% y CHX al 2%. Finalmente se procedió a la lectura de los halos de inhibición pasadas las 48 horas, donde se demostró mayor inhibición para la CHX en comparación con los EAP ecuatoriano al 30% y al 50%; no excluyendo así el efecto antibacteriano de los extractos acuosos de propóleo.

Mayta F, cols. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Staphylococcus aureus (ATCC 25923). 2010 (11). Este estudio in vitro tuvo como objetivo demostrar el efecto antibacteriano mediante una evaluación del streptococcus mutans y staphylococcus aureus, para poder compararlas se tuvo soluciones de propóleo de 10% y 30%; este fue obtenido de Oxapampa y comparados con dos concentraciones de CHX al 0,12 y 0,05% a su vez también será comparada con el agua destilada y listerine. Se realizó mediante el método de Kirby-Bauer. Obteniendo como resultado para el streptococcus aureus, el EEP al 30% presentó mayor eficacia. También se concluyó que el EEP al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano frente al listerine; contra el streptococcus mutans, de la misma manera en efectividad que la clorhexidina 0,05% frente al staphylococcus aureus.

Eguizábal M, cols. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre Streptococcus mutans y Lactobacillus casei. 2007 (12). Este estudio tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del EEP proveniente de Pasco en el valle de Oxapampa. Se realizó por medio de un método de difusión en placa usando cepas de streptococcus mutans y lactobacillus casei, estas cepas fueron expuestas frente a soluciones de 30%, 20% y 0,8% v/v del extracto etanólico de propóleo y ser comparadas con la CHX al 0,12% y alcohol al 70%. Los resultados indicaron que el efecto antibacteriano del EEP al 0,8% y la acción que presenta es mayor que la CHX, para el streptococcus mutans y

el lactobacillus casei el EEP en solución al 0,8% presento un mayor efecto antibacteriano que la CHX al 0,12% frente al streptococcus mutans y lactobacillus casei.

Moreno Z., Martínez P. y Figueroa J. Efecto antimicrobiano In vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. 2007 (17). Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de cuatro extractos de propóleos argentinos, cinco colombianos y uno cubano frente a streptococcus mutans. Fue de tipo experimental in vitro, las muestras fueron obtenidas por extracción con alcohol etílico al 96%. Entonces la actividad bactericida y bacteriostática fue medida por concentración mínima inhibitoria en un rango entre 0.02 y 15 mg/ml. Los propóleos que presentaron mayor efecto bactericida fueron el 2 y el 3 (muestras colombianas) luego de 48 horas de incubación. El mejor efecto bacteriostático lo presentó la muestra 2 (propóleo colombiano) a un periodo de incubación de 24 horas. En conclusión, el 70% de las muestras de propóleo incrementaron su actividad luego de un tiempo de incubación de 48 horas, en relación con el efecto detectado a las 24 horas.

Ayala C., Castillo E. y Mejía L. Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana. 2016 (18). Este estudio tuvo como objetivo determinar su actividad antibacteriana in vitro en cepas estandarizadas de streptococcus mutans. Para ello desarrollaron un enjuague bucal con la concentración mínima bactericida de propóleo fue de 1,5ug/ml y

como material biológico 10 placas de *S. mutans*. Los resultados obtenidos determinaron que el enjuague bucal a base de propóleo puro tiene mayor promedio de halo de inhibición en relación a las diluciones 1:2, y 1:4 con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). En conclusión el enjuague bucal elaborado a base de propóleo peruano, tiene calidad farmacéutica y efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Streptococcus mutans*.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 BASES CIENTÍFICAS

2.2.1.1 Caries

La caries dental es una disbiosis, esta se refiere a la alteración que existe entre el equilibrio y proporción que se da en los microorganismos y sus diversas especies de la flora oral, esta se logra evidenciar principalmente por el alto consumo de azúcares (1) (19) (20).

La caries dental está localizada en la superficie dental que se genera de situaciones metabólicas que tendrán origen en la placa dental por eso se dice que es una disolución química, estas situaciones metabólicas son llamadas procesos cariosos. La relación que existe entre los tejidos duros y los depósitos microbianos del diente pueden dar origen a una lesión cariosa (19).

La caries dental es una enfermedad multifactorial donde el factor etiológico tal como el consumo frecuente de azúcar tiene una gran relevancia en la caries dental (2). El azúcar tiene que ser metabolizada principalmente por el streptococcus mutans (21). La patogenicidad dependerá de su forma de interacción con otras bacterias y de sus propiedades individuales.

Los ácidos orgánicos serán productos del metabolismo, estos son los responsables de remover el mineral de la pieza dentaria, también depende de ciertos factores como la calidad de la saliva y estructura dentaria. Todos estos factores se relacionan de manera combinada, se obtendrá la pérdida mineral neta del diente, iniciándose así al proceso de caries dental (22). Keyes en 1960 determinó que la etiopatogenia de la caries dental se da a partir de la relación de 3 principales factores: huésped, microorganismo y sustrato.

Es por esto que se planteó los siguientes factores etiológicos:

A. Huésped:

Es el que alberga a la caries dental, refiriéndose a aquellos factores los cuales participan en la fisiología del ser humano el cual permite el desarrollo de la enfermedad.

Incluye la boca y todos los componentes que están dentro de ella (23). Los factores asociados al huésped pueden dividirse en grupos: diente, saliva e inmunización:

a. Diente

El diente presenta tres características que están relacionados con el desarrollo de las caries: proclividad, permeabilidad adamantina y anatomía.

La proclividad se refiere a los dientes que tienen sus superficies más susceptibles a la formación de caries dental. Los prismas presentan la presencia abundante de fosfato y carbonatos de calcio a nivel del esmalte, pero en cuanto avanza la lesión cariosa al interior del diente se van presenciando los carbonatos (2).

La permeabilidad adamantina, pierde capacidad de añadir moléculas a su estructura las cuales mejoran sus propiedades físico-químicas esto se presenta en cuanto se va disminuyendo la edad. La resistencia y la velocidad del avance de la lesión son determinadas por proporción de los componentes del esmalte.

La anatomía que hace referencia a las fosas y fisuras profundas, puntos de contacto y la oclusión de los dientes, presentan relación con la aparición de lesiones cariosas porque fomentan la acumulación de placa y alimentos pegajosos, también dificultan el poder realizar una correcta limpieza bucal (19).

b. Saliva

La saliva contiene enzimas, flúor, proteínas, agentes buffer, inmunoglobulinas y glicoproteínas entre otros diversos elementos sumamente importantes para prevenir que se formen las caries dental (24).

La acción salival contribuye con la formación de la microflora, esto se da por 2 efectos principales: antimicrobianos apartando microorganismos patógenos y manteniendo la flora normal; y nutricionales.

La saliva tendrá y cumplirá un rol protector, mediante las siguientes acciones:

- La dilución y lavado de azúcares en la dieta diaria.
- Neutralización y amortiguación de ácidos de la placa dental.
- La provisión de iones para la remineralización (19).

c. Inmunización

El sistema inmunitario tiene la capacidad de interactuar frente a la microflora, generando una respuesta humoral que se expresará en anticuerpos de tipo Inmunoglobulina A salival, Inmunoglobulina G sérica y una respuesta celular mediante linfocitos T. Las diferencias que existen en la respuesta inmune a los microorganismos van a depender del antígeno y el huésped.

B. Microflora

Para comprender como se produce la caries dental a base de la acción que tienen las bacterias, es importante conocer los diversos mecanismos de estos microorganismos por los que colonizan el diente y son capaces generar virulencia (2).

a. Colonización bacteriana

El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva que son absorbidas por el esmalte dental.

Para la colonización bacteriana, es imprescindible la formación previa de una fina película de proteínas salivales sobre la superficie del diente: la ya mencionada película adquirida.

b. Factores de virulencia

Los factores de virulencia más relacionados con la producción de caries son:

- Acidogenicidad: El streptococcus mutans logra que los azúcares consumidos diariamente principalmente logren formar ácido láctico como un producto final del metabolismo, obteniendo así que el pH disminuya generando que se desmineralice el esmalte (16).
- Aciduricidad: En un medio bajo de pH se logra producir ácido.
- Acidofilicidad: El Streptococcus mutans resiste la acidez del medio bombeando protones (H⁺) hacia el exterior de la célula.
- Síntesis de polisacáridos intracelulares, como el glucógeno: Se utiliza la reserva alimenticia y así mantener toda la producción de ácido por

periodos largos de tiempo aún sin la presencia de consumo de azúcar.

- Producción de dextranasa: Puede movilizar reservas de energía además esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano (24).

c. Factores de tiempo en el desarrollo de la caries

La caries es considerada una enfermedad crónica porque las lesiones cariosas se desarrollan durante un periodo largo. La probabilidad de aparición de caries anualmente alcanza un pico, entre 2 y 4 años seguida de la aparición del primer diente y se mantiene después de este tiempo, mostrando así posiblemente una maduración post eruptiva de la superficie del esmalte.

C. Sustrato

Dentro de los factores que favorecen el desarrollo de la caries dental, uno de los más estudiados es el consumo excesivo de azúcares simples. Numerosos estudios han demostrado la asociación entre caries y carbohidratos refinados o azúcares, especialmente, la sacarosa o azúcar común.

Los azúcares consumidos con la dieta constituyen el sustrato de la microflora bucal y dan inicio al proceso de cariogénesis.

La sacarosa, formada por dos monosacáridos simples: la fructosa y la glucosa; se considera el más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino porque el *Streptococcus mutans* lo utiliza para producir glucano, polisacárido extracelular, que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, inhibiendo las propiedades de difusión de la placa.

2.2.1.2 Distribución de los microorganismos en la cavidad bucal

La cavidad oral presenta microorganismos de tipos de superficies específicos donde estos logran colonizar tanto los tejidos blandos como los dientes (2) (4).

- Labios: Zona de interacción entre la microbiota de la boca y piel; el *Staphylococcus*, *Micrococcus* sp y bacilos de tipo gram negativos son microorganismos característicos de la piel.
- Mucosa yugal: Destacan los *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitior* y *Streptococcus sanguis*
- Lengua: Predominan los *Streptococcus salivarius*, *S. mitior* y en su minoría de *S. milleri* y *S. sanguis*.
- Paladar: Una incorrecta higiene oral colabora con el desarrollo de la *Cándida albicans* este es un hongo levaduriforme. Predominan los *Lactobacillus* sp, *Haemophilus* sp y *Streptococcus* sp.
- Saliva: No va a poseer microbiota propia.
- Surco gingival: Se tiene la presencia de microorganismos en dos casos en un estado de

salud (detectan grampositivos aerobios y anaerobios facultativos *S. sanguis*, *S. mintor*, enterococos y bacilos filamentosos) y en un estado de enfermedad (anaerobios gram negativos: *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonellas* y *treponemas*) (19).

2.2.1.3 *Streptococcus mutans*

Etimológicamente “*Streptus*” significa flexible y “*coccus*” significa grano o baya. Están formados por bacterias esféricas u ovoides; estos crecerán en pares o cadenas de una longitud variable (25).

Se caracteriza en su gran mayoría por ser anaerobios facultativos, debido a la existencia de algunas especies de anaerobios. Además, son Gram positivos, no formadores de esporas, catalasa negativa e inmóvil (4).

Los *streptococcus mutans* se encuentran presentes en la biopelícula de la placa bacteriana supragingival, tienen la capacidad de provocar la pérdida de minerales y posterior formación de una cavidad, gracias a sus factores de virulencia (13).

2.2.1.4 Propóleo

2.2.1.4.1 Etimología

Propóleo proviene del griego “pro” que significa defensa de; y “polis” que significa panal (26).

2.2.1.4.2 Definición

Es un producto de origen natural su procedimiento comienza con la secreción de ciertas especies vegetales como árboles o arbustos, el cual será recogido y elaborado por las abejas, lo obtenido posteriormente será modificado con las secreciones salivares y finalmente esto será transportado al interior de la colmena (7) (10) (27).

El propóleo es una sustancia resinosa que dependiendo de su origen botánico puede ser de color castaño, verde pardo hasta llegar a un color negro, frecuentemente presenta un sabor amargo con un olor agradable de tipo dulce, de esta manera cuando se quema el propóleo emite una fragancia aromática (4) (28).

2.2.1.4.3 Características

- Estructura: No homogénea, espesa, dependerá del método de cosecha.
- Color: amarillo, amarillo-verdoso, verde oscuro, pardo, pardo oscuro, pardo rojizo, hasta negro.
- Consistencia: Pegajosa cuando recibe temperaturas de más de 15°C y líquida a temperaturas entre 60 a 70 °C.
- Olor: Aromático, se siente la presencia de miel y aceites esenciales. También existen propóleos inoloros.
- Sabor: En raras ocasiones picante e insípido, frecuentemente amargo (3).

2.2.1.4.4 Propiedades terapéuticas

Antiguamente el propóleo ha sido utilizado en el campo de la medicina ya que presentó diversas propiedades medicinales (7) tales como:

- Anestésico local: Presenta acción antihemorrágica y cicatrizante (10).
- Acción bactericida y bacteriostática: Este trabaja como un afecto antibiótico frente a cocos Gram positivos: *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*; frente a bacilos Gram positivos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus larvae*, (causante de la loque americana), *Corvne bacteriumequi*; frente a algunas especies (*Aspergillus ochraceus*) y frente a levaduras (*Saccharomy cescerevisiae*) (10) (5) (7).
- Tratamiento de enfermedades respiratorias: Es utilizado en el tratamiento de las vías respiratorias porque presenta resultados positivos (10).
- Acción dermatológica: Primordialmente para procesos como grietas, diversas supuraciones, callosidades, verrugas, abscesos, forúnculos, eczemas y psoriasis, entre otros (15) (29).

2.2.1.4.5 Usos del própoleo en odontología

En el área de la Odontología diversas investigaciones científicas que atribuyeron que

el propóleo presenta diversas propiedades tales como: bacteriostáticas, antifúngicas, anestésicas y cicatrizantes (13).

El propóleo en odontología tiene diversos usos dentro de los cuales resalta:

- Reduce la sensibilidad dental.
- Actividad cariogénica: El propóleo actuará inhibiendo la actividad del principal microorganismo productor de caries dental, el streptococcus mutans; los extractos limitan la placa bacteriana y reducen la caries dental(30).
- Incluso ayuda a regenerar la pulpa dental, tejido óseo y del cartílago (30).
- Periodoncia: En el tratamiento de periodontitis y gingivitis actúa de manera eficaz; porque el propóleo tiene un efecto sobre el periodonto ya que presenta un efecto cicatrizante, antimicrobiano, anestésico y antiinflamatorio (13) (27) (31).

2.2.1.5 Gluconato de clorhexidina

2.2.1.5.1 Definición

Es un agente antimicrobiano tópico. Aumenta su efectividad ya que esta molécula es soluble en alcohol y agua. También presenta baja toxicidad y una fuerte capacidad para adherirse a mucosas, microorganismos y película adquirida (32).

2.2.1.5.2 Concentración

El gluconato de clorhexidina es presentado como un potente antiséptico, este es utilizado como colutorio, la clorhexidina se presenta en dos concentraciones las cuales son al 0,12% y al 2% son las más empleadas en el área de la Odontología (5).

2.2.1.5.3 Usos en odontología

- Prevención en cirugía en infecciones bucales pre y post quirúrgicas.
- Prevención de caries dental.

- Tratamiento periodontal.
- Irrigación para tratamientos radiculares.
- Desinfección de cavidades antes de la obturación.

CAPITULO III

VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES

3.1 Hipótesis

El extracto etanólico del propóleo tiene un mayor efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans* que la clorhexidina al 0.12%.

3.2 Operacionalización de las variables

Variable de estudio		Indicadores	Categorización	Escala de medición
Agentes antibacterianos	Extracto etanólico del propóleo	Dilución	Concentración al 25%	Nominal
			Concentración al 50%	Nominal
			Concentración al 75%	Nominal
	Gluconato de Clorhexidina (Grupo control)	-	Concentración al 0,12%	Nominal
Efecto antibacteriano		Halos de Inhibición de crecimiento bacteriano.	Resistente(-) si fue <9mm	Ordinal
			Limite intermedio (Sensible =+) 9 a 14 mm	
			Sensibilidad media (muy sensible =++) >14 a 19 mm	
			Sumamente sensible (S.S. = +++) >20mm	

CAPITULO IV

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 Diseño de la investigación

El presente estudio se trató de un diseño experimental porque se utilizó técnicas de cultivo en inoculados con cepas de ***Streptococcus mutans*** (*S. mutans*) ATCC 25175 a los cuales se les aplicó discos con diferentes concentraciones de Extracto Etanólico de Propóleo (EEP).

4.2 Tipo de investigación

- Experimental porque se determinó de manera in vitro y fue intervenido sobre las variables.
- Transversal ya que este estudio se realizó y midió solo una vez en un tiempo determinado.
- Prospectivo porque todos los datos obtenidos para esta investigación fueron de primera fuente ya que se recolectaron los datos propios para esta investigación.
- Analítico porque se planteó una hipótesis en la cual se buscó permitir conocer el estudio del efecto antibacteriano y se tuvo más de una variable es decir será bivariado.

4.3 **Ámbito de estudio**

El presente estudio laboratorial se desarrolló en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna.

Desarrollado entre los meses de Diciembre 2019 y Enero - Junio 2020.

4.4 **Población y muestra**

Para la ejecución del diseño experimental la población que se estudió fue conformada por las cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y conjunto de cultivo de placas Petri con las diferentes concentraciones (25%, 50% y 75%) de Extracto Etanólico de Propóleo.

4.4.1 Criterios de inclusión:

- Cepa de “***Streptococcus mutans*** ATCC 25175”
- Extracto Etanólico de Propóleo.
- Gluconato de Clorhexidina al 0,12%.

4.4.2 Criterios de exclusión:

- Cepas de “*Streptococcus mutans*” que no pertenezcan al grupo viridans.
- Placas Petri contaminada y fracturadas.
- Gluconato de Clorhexidina que no corresponda al 0,12%.

4.5 Instrumentos de recolección de datos

4.5.1 Coordinación

Mediante una solicitud se coordinó con la Facultad de Ciencias de la Salud

Una vez obtenido dicha solicitud, se presentó a Decanatura de la Facultad de Ciencias de la Salud y se coordinó con el Biólogo a cargo del laboratorio de la facultad con el fin de poder ejecutar el presente estudio de investigación.

4.5.2 Técnicas de recolección de los datos

Se utilizó la técnica de observación directa. Los datos que fueron obtenidos estuvieron registrados en una ficha de recolección de datos para el posterior análisis.

4.5.3 Ficha de recolección de datos

Esta ficha se realizó para usarla de manera exclusiva para la investigación, esta fue diseñada para registrar el diámetro de los halos en mm por concentraciones (ANEXO 1).

Se utilizó esta ficha para poder recolectar los datos, este procedimiento se realizó mediante el programa de Microsoft Office Excel para su procesamiento.

Una vez realizado el procesamiento, se transfirió la información al programa SPSS Statistics 18, las cuales fueron analizadas ordenadamente, según el origen de las variables.

Posteriormente los resultados fueron presentados mediante gráficos y tablas estadísticas los cuales dieron una respuesta a los objetivos planteados en la investigación.

4.5.4 Instrumentos

4.5.4.1 Equipos

- Estufa Memmert
- Autoclave Lab. Companion

- Balanza electrónica Denver Instrument
- Balanza analítica Sartorius Basic
- Incubadora Binder
- Centrífuga Greet med
- Equipo de Vórtex MS1 Minishaker IKA

4.5.4.2 Material de vidrio

- Matraces 100 ml Shott Duran
- Matraces 250 ml Shott Duran
- Matraces 500 ml Shott Duran
- Micropipeta de 10 μ l Boeco Germany
- Micropipeta de 100 μ l Boeco Germany
- Micropipeta de 1000 μ l Boeco Germany
- Pipeta graduada de 10 ml Boeco Germany
- Pipeta graduada de 15 ml Boeco Germany
- Pipeta graduada de 20 ml Boeco Germany
- Vaso precipitado de 250 ml Boeco Germany
- Vaso precipitado de 400 ml Boeco Germany
- Vaso precipitado de 600 ml Boeco Germany
- Frascos de vidrio de 250 ml Boeco Germany
- Frascos de vidrio de 500 ml Boeco Germany
- Tubos de ensayos de 10 ml Pirex
- Tubos de ensayos de 10 ml Pirex

- Tubos de ensayos con tapa de 20 ml Pirex
- Frascos color ámbar de 30 ml YB 440
- Probeta de 100 ml LMS Germany

4.5.4.3 Medios de cultivo, bacteria y reactivos

- Agar Brain Heart Infusion Diagnostici Liofilchem
- Caldo Brain Heart Infusion Diagnostici Liofilchem
- Tioglicolato Diagnostici Liofilchem
- Alcohol al 70° Alkofarma
- Bacteria Streptococcus mutans ATCC 215175 Gem Lab
- Agua estéril Braun
- Clorhexidina al 0,12% Dentac

4.5.4.4 Otros

- Manoplas Greal Glove
- Mascarilla Pro Med
- Gorro Pro Med
- Mandil de laboratorio
- Soporte universal
- Espátula Zhermack
- Pinzas

- Papel filtro wathman N°42 GE Healthcare life sciences
- Algodón Coppon
- Papel aluminio Nice
- Papel toalla Elite
- Papel crepado para esterilizar
- Marcadores Faber Castelle
- Regla Faber Castelle
- Encendedor Clipper
- Tubo falcon de 15 ml
- Hisopos de madera estéril Marco
- Tips para micropipeta 1000 µl Global Roll
- Tips para micropipeta 2000 µl Global Roll
- Placas Petri descartable Samplix
- Ron de quemar
- Calculadora Casio

CAPITULO V

PROCEDIMIENTOS DE ANÁLISIS DE DATOS

5.1 Recolección de la muestra

5.1.1 Recolección del propóleo

En primer lugar se inició con la recolección del propóleo derivado y originario de la ciudad de Tacna (Abejas Monte Flor Perú) ubicado en Av. Miguel Grau 2005 C.P. Bolognesi – TACNA solo fueron necesarios 200gr de propóleo los cuales se recolectaron mediante todas las medidas de higiene necesarias para impedir su contaminación. De esta manera finalmente se pudo transportar el propóleo hasta el laboratorio, este fue almacenado en un área que mantuvo una temperatura ambiente (ANEXO 2).

5.1.2 Procesamiento del extracto etanólico de propóleo

Para la extracción del Extracto Etanólico de Propóleo obtenido de la ciudad de Tacna, el propóleo en primer lugar fue previamente seleccionado de todas aquellas partículas e impurezas.

Seguidamente se procedió a cortar el propóleo para que de esta manera facilitar el licuado y obtener partículas pequeñas de propóleo, estas partículas pequeñas fueron colocadas en un frasco de vidrio estéril (Boeco) de 500ml, donde se agregó aproximadamente 92gr. de propóleo.

Luego se añadió 250ml de alcohol al 70% hasta cubrir en su totalidad el contenido, este frasco fue envuelto con papel aluminio por completo, se agitó tres veces al día por 5 minutos; después de 19 días de maceración y almacenamiento a 37°C, se procedió a filtrarlo varias veces a través de doble papel de filtro Wathman N°42; en un matraz de fondo redondo y de esta manera se obtuvo la solución etanólica del propóleo.

Finalmente se colocó en la estufa para la deshidratación a 59 °C y de esta manera se extrajo el etanol, donde este se eliminó en su totalidad.

5.1.3 Obtención de las diferentes concentraciones del extracto

Se retiró de la estufa y se raspó todo el material, con ayuda de un mortero este material se convirtió en polvo donde se obtuvo un peso de 3,001gr.

Se mezcló 3gr con 37.5ml de alcohol dando como resultado el 100% del Extracto Etanólico de Propóleo.

Para obtener las concentraciones se colocó 2.5ml, 5ml y 7.5ml de alcohol en distintos envases estériles donde se les añadió 7.5ml, 5ml y 2.5ml de Extracto Etanólico de Propóleo de la ciudad de Tacna respectivamente, para así obtener las concentraciones de 25%, 50% y 75%.

5.2 Obtención de las cepas en estudio - ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175

Las bacterias fueron recolectadas y obtenidas de un laboratorio y distribuidor de cepas bacterianas (GenLab).

5.3 Evaluación de los agentes antibacterianos

El efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de Propóleo de la ciudad de Tacna se evaluó mediante pruebas de sensibilidad bacteriana in vitro, donde se utilizó el método de difusión en disco (Kirby Bauer).

5.3.1 Preparación del inóculo Bacteriano de ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175

Se obtuvo la cepa liofilizada de *S. Mutans* (ATCC 25175) la cual se cultivó en placas Petri en un

medio de Agar y Caldo, cerebro – corazón y tioglicolato a 37°C.

Para la activación de la cepa se procedió a romper las bombillas en donde se encontraba almacenada la cepa y fue colocada en Agar cerebro – corazón y se llevaron a incubación a 37°C en microaerofilia durante 48 horas en una jarra de anaerobiosis.

Posteriormente se transfirió cinco colonias con un asa bacteriológica y estas fueron colocadas en un tubo de conteniendo de 8 ml de BHI y fueron incubadas durante 24 horas en microaerofilia en una jarra de anaerobiosis. A partir de esta suspensión se realizó el sembrado con la técnica de hisopado, que consistió en esparcir 10 veces el caldo preparado sobre el agar cerebro corazón a doble capa de 4 mm de grosor y se llevaron a incubación a 37°C en anaerobiosis durante 48 horas.

5.3.2 Preparación de los discos

Se impregnaron discos de papel filtros previamente esterilizados de 6 mm de diámetro antibacterianos tales como el Extracto Etanólico de Propóleo y Gluconato de Clorhexidina.

5.3.3 Dispensación de los discos a las placas inoculadas

Se utilizaron e incorporaron discos de 6 mm de diámetro previamente esterilizados, los discos fueron embebidos con:

- Extracto Etanólico de Propóleo
- Gluconato de Clorhexidina

Se emplearon un total de 8 placas para esta prueba. Se realizó el método de difusión con discos (Kirby Bauer).

Las placas fueron dejadas incubadas a una temperatura de 37°C durante 48 horas para poder observar los distintos halos de inhibición que se irán formando.

5.3.4 Lectura:

Seguidamente al periodo de incubación, se procedió a medir los distintos halos de inhibición de crecimiento con el compás de vernier en unidad de milímetros. Se realizó la lectura midiendo los halos de inhibición sobre el crecimiento de todos los microorganismos alrededor del disco.

El diámetro de inhibición en esta zona es directamente proporcional a la actividad antibacteriana del Extracto Etanólico de Propóleo y el gluconato de clorhexidina sobre los microorganismos estudiados.

Para realizar la interpretación de los resultados obtenidos se tomó como referencias las pautas por DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983 que considera la eficacia antibacteriana sobre ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175 según los halos de crecimientos como:

- Resistente (-) si fue ≤ 9 mm
- Límite Intermedio (Sensible=+) de 9 a 14 mm
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) >14 a 19 mm
- Sumamente sensible (S.S.= +++) ≥ 20 mm.

5.4 Cromatografía

Se coordinó la realización del análisis físico-químico del EEP con el laboratorio de la Universidad Católica de Santa María de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas “Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, con sede en la ciudad de Arequipa en el Perú.

De igual manera se solicitó al laboratorio certificado de la realización del ensayo, iniciándose el ensayo el 07 de Enero del 2020 (ANEXO 3).

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

Se entregó la muestra de EEP obteniéndose el informe N° ANA07A20.004467. El análisis por cromatografía en capa fina realizado al EEP puro identificó y reportó la presencia de terpenos, di terpenos y terpenoidales como metabolitos secundarios (ANEXO 4).

El revelado de la cromatoplaaca donde se observan las manchas correspondientes a los metabolitos hallados se muestra en el ANEXO 4.

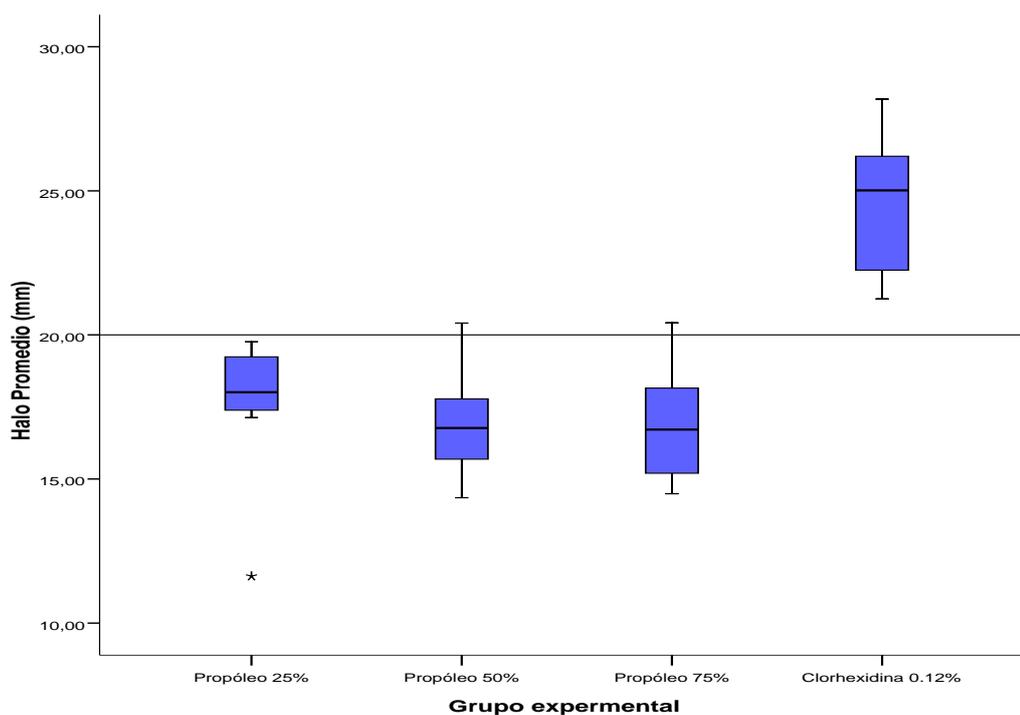
TABLA Nro. 01

**ESTADISTICOS DESCRIPTIVOS EXTRACTO DE PROPÓLEO AL 25%,
50%, 75% Y CLORHEXIDINA 0,12%**

Agentes antibacterianos	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Propóleo al 25% Halo (mm)	8	11.63	19.76	17.5831	2.57734
Propóleo al 50% Halo (mm)	8	14.35	20.41	16.9050	1.89188
Propóleo al 75% Halo (mm)	8	14.49	20.42	16.8813	2.01371
Clorhexidina 0.12% Halo (mm)	8	21.25	28.18	24.5438	2.48699

GRÁFICO Nro. 01

DIAGRAMA DE CAJA: EXTRACTO DE PROPÓLEO AL 25% , 50%, 75% Y CLORHEXIDINA 0,12%



INTERPRETACIÓN:

En la presente tabla y gráfico se pueden apreciar la distribución por estadísticos descriptivos donde para el extracto de Extracto Etanólico de Propóleo al 25 % corresponde a un mínimo de 11,63 mm, un máximo de 19,76 mm. con un promedio de 17,5831 mm de 2,57734 mm.

Para el Extracto Etanólico de Propóleo al 50 % en la medición Media corresponde a un mínimo de 14,35 mm, un máximo de 20,41 mm con un promedio de 16,9050 mm de 1,89188 mm.

Para el Extracto Etanólico de Propóleo al 75 % en la medición Media corresponde a un mínimo de 14,49 mm, un máximo de 20,42 mm con un promedio de 16,8813 mm de 2,01371 mm.

Finalmente para la Clorhexidina al 0,12% en la medición Media corresponde a un mínimo de 21,25 mm, un máximo de 28,18 mm con un promedio de 24,5438 mm de 2,48699 mm.

CONTRASTE DE HIPÓTESIS

En primer lugar comprobaremos si los halos de crecimiento (mm) cumple con el criterio de normalidad basándonos en la prueba de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk por medición y grupo de estudio.

Pruebas de normalidad

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halo Promedio (mm)	Propóleo 25%	.305	8	.027	.754	8	.009
	Propóleo 50%	.182	8	.200(*)	.943	8	.636
	Propóleo 75%	.131	8	.200(*)	.953	8	.746
	Clorhexidina 0.12%	.245	8	.174	.911	8	.361

Fuente: Ficha de recolección de datos

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

A: Corrección de la significación de Lilliefors.

H₀: Los datos se distribuyen de manera normal.

H₁: Los datos se distribuyen de manera No normal.

Los resultados muestran que según Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk que su valor p ó Sig. son mayores a 0,05, por lo tanto **No se Rechaza H₀**.

Por tanto se concluye que debe usarse una prueba Paramétrica.

En segundo lugar la prueba a elegir es la prueba paramétrica de Análisis de ANOVA.

ANOVA

		Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Halo Promedio (mm)	Inter-grupos	332.936	3	110.979	21.694	.000
	Intra-grupos	143.234	28	5.116		
	Total	476.170	31			

Se realiza la prueba de ANOVA para demostrar diferencia entre las variables, donde con un valor Sig. o valor p es menor a 0,05 por lo tanto existe diferencia la media de las mediciones del Halo en milímetros de crecimiento entre los grupos estudiados.

Ho: No Existe diferencia entre el Extracto Etanólico de Propóleo y la Clorhexidina.

H1: Existe diferencia entre el Extracto Etanólico de Propóleo y la Clorhexidina.

$\alpha = 0,05$.

Como $P < \alpha$ se rechaza Ho.

Decisión: Existe diferencia entre la media del Extracto de Propóleo y la Clorhexidina.

En tercer lugar se agrega la prueba Paramétrica del Análisis de ANOVA: comparaciones múltiples POST HOC.

Ho: No Existe diferencia entre la media del Extracto de Propóleo 25%, Propóleo 50%, Propóleo 75% y la Clorhexidina al 0,12%.

H1: Existe diferencia entre la media del Extracto de Propóleo 25%, Propóleo 50%, Propóleo 75% y la Clorhexidina al 0,12%.

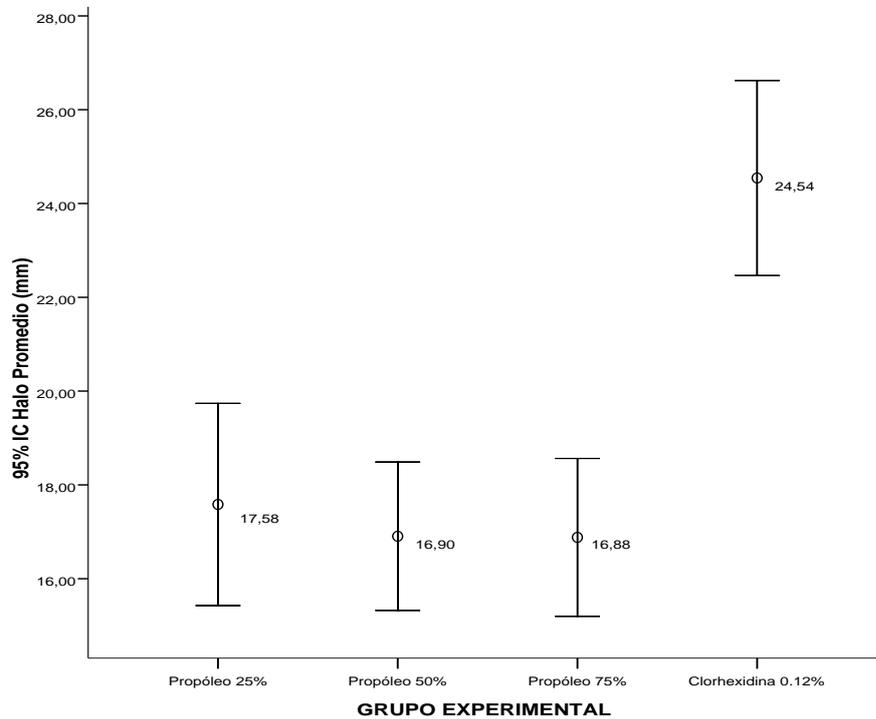
$\alpha = 0,05$

COMPARACIONES MÚLTIPLES

Variable dependiente HSD de Tukey	(I) GRUPO	(J) GRUPO	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Halo Promedio (mm)	Propóleo 25%	Propóleo 50%	.67813	1.13088	.931	-2.4095	3.7658
		Propóleo 75%	.70188	1.13088	.925	-2.3858	3.7895
		Clorhexidina 0.12%	-6.96063(*)	1.13088	.000	-10.0483	-3.8730
	Propóleo 50%	Propóleo 25%	-.67813	1.13088	.931	-3.7658	2.4095
		Propóleo 75%	.02375	1.13088	1.000	-3.0639	3.1114
		Clorhexidina 0.12%	-7.63875(*)	1.13088	.000	-10.7264	-4.5511
	Propóleo 75%	Propóleo 25%	-.70188	1.13088	.925	-3.7895	2.3858
		Propóleo 50%	-.02375	1.13088	1.000	-3.1114	3.0639
		Clorhexidina 0.12%	-7.66250(*)	1.13088	.000	-10.7501	-4.5749
	Clorhexidina 0.12%	Propóleo 25%	6.96063(*)	1.13088	.000	3.8730	10.0483
		Propóleo 50%	7.63875(*)	1.13088	.000	4.5511	10.7264
		Propóleo 75%	7.66250(*)	1.13088	.000	4.5749	10.7501

* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

GRÁFICO INTERVALO DE CONFIANZA: CRECIMIENTO BACTERIANO A DIFERENTES CONCENTRACIONES EXTRACTO DE PROPÓLEO VS CLORHEXIDINA.



En el presente gráfico se puede apreciar la distribución por crecimiento bacteriano medido por el halo en milímetros donde se puede apreciar a diferentes concentraciones el halo del propóleo crece menos en relación a la clorhexidina, vale decir que el efecto del Propóleo no supera al de la Clorhexidina.

Como $P < \alpha$ se rechaza H_0

Decisión: Existe diferencia entre la media del Extracto Etanólico de Propóleo 25%, Propóleo 50%, Propóleo 75% y la Clorhexidina, es decir que el crecimiento bacteriano difiere del actuado el Propóleo en diferentes concentraciones con respecto a la clorhexidina.

Como a continuación se observa:

Media Propóleo 25% = Media de Propóleo 50% = Media de Propóleo 75% \neq Media de Clorhexidina 0.12%

Para el Efecto antibacteriano observando los Halos de Inhibición de crecimiento bacteriano. El Extracto Etanólico de Propóleo al 25%, al 50% y al 75% presentan Sensibilidad Media (muy sensible =++) >14 a 19 mm mientras que la Clorhexidina presenta inhibición de crecimiento antibacteriano Sumamente sensible (S.S. = +++) >20mm.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

DISCUSION

En los últimos años, los estudios han demostrado las distintas limitaciones de los agentes antimicrobianos disponibles en todo el mercado dental, irrigantes endodónticos como la clorhexidina pesar de presentar excelentes propiedades antimicrobianas resulta difícil no mencionar sus efectos secundarios, por lo cual los productos naturales llaman mucho la atención como alternativas terapéuticas más seguras.

La caries dental es una enfermedad multifactorial y el *Streptococcus mutans* es el principal agente bacteriano en la génesis de la caries dental, Frente a dietas altas en carbohidratos el *S. mutans* produce ácidos orgánicos como resultado del metabolismo del azúcar; estos ácidos son responsables de remover el mineral de la pieza dentaria y posteriormente generar lesiones cavitadas.

Frente a la búsqueda de nuevas propuestas de carácter preventivo o de tratamiento, diversas investigaciones han propuesto el uso de agentes naturales con el objetivo de comprobar su efectividad frente al *S. mutans* u otras bacterias precursoras de la caries. El propóleo ha sido ampliamente empleado en el área de la salud, como anestésico local, bactericida, bacteriostático, tratamiento de enfermedades respiratorias y

acción dermatológica. En el campo de la odontología el propóleo también ha sido empleado como bacteriostático, antimicrobiano, antifúngico, anestésico y cicatrizante. Es por esta razón que el presente trabajo de investigación pretende evaluar el efecto antibacteriano de estos recursos naturales como el propóleo sobre cepas de *S. mutans* ATCC 25175.

Destacando que los antimicrobianos utilizados para realizar este estudio fueron el gluconato de clorhexidina al 0,12% de origen químico y extracto etanólico de propóleo Peruano-Tacneño al 25%, 50% y 75% de origen natural; hago referencia que al igual que otros propóleos en el mundo; el propóleo Peruano-Tacneño tiene efecto antibacteriano para reducir la cantidad de “*S. mutans*” en la cavidad oral, con esto la formación de placa bacteriana y por consiguiente reducir el índice de caries dental. En este caso hubo una mayor eficacia para el gluconato de clorhexidina al 0,12%; en relación al extracto etanólico de propóleo Peruano-Tacneño al 25%, 50% y 75% respectivamente.

Observando los siguientes resultados el extracto etanólico de propóleo ejerce un efecto antibacteriano a cualquier concentración sobre la clorhexidina resultados similares al presentado por **Huaytalla M, cols.** donde observaron que el extracto etanólico de propóleo al 30% es más efectivo in vitro que la clorhexidina al 0,12% para lograr controlar la presencia de *lactobacillus acidophilus*.

Airen B, cols. observaron que a concentraciones de 5% y 20%, el extracto etanólico de propóleo fue efectiva contra el *streptococcus mutans* y *lactobacillus acidophilus*. La actividad más alta se mostró con clorhexidina al 0.2% concluyendo así que el propóleo obtenido de la

región de la India si posee efecto antibacteriano contra lactobacillus acidophilus y streptococcus mutans.

Otro estudio ha demostrado el efecto antibacteriano, donde **Rueda M.** demostró que a la lectura de los halos a las 48 horas se evidenció mayor inhibición para la clorhexidina al 2%, que para los extractos acuosos de Propóleo, no excluyendo así el efecto antibacteriano de los extractos acuosos. Comparándolo con nuestro trabajo de investigación podemos plantear que el extracto etanólico de propóleo tiene también efectos antibacterianos al igual que un extracto acuoso comparado con la clorhexidina al 2%.

Según el estudio de **Mayta F, cols.** determinaron para el streptococcus aureus, el extracto etanólico de propóleo al 30% presentó mayor eficacia. También se determinó que para el streptococcus mutans, el extracto etanólico de propóleo al 10% y 30% a las 24 y 48 horas no mostraron diferencia significativa; concluyendo así que el extracto etanólico de propóleo al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano frente al listerine; contra el streptococcus mutans e igual en efectividad que la clorhexidina 0,05% frente al staphylococcus aureus.

Según el estudio de **Eguizábal M, cols.** demostraron que el extracto etanólico del propóleo peruano en solución al 0,8% tiene una mejor acción antibacteriana contra S. mutans que la Clorhexidina al 0,12%. Comparándolo con nuestro trabajo de investigación podemos plantear que el extracto etanólico de propóleo tiene también posee efectos antibacterianos al igual que un extracto etanólico en solución al 0,8% comparado con la clorhexidina al 0,12%.

Según el estudio de **Moreno Z., Martínez P. y Figueroa J.** demostraron el efecto bactericida de las muestras colombianas luego de 48 horas de incubación. El mejor efecto bacteriostático lo presentó la muestra de propóleo colombiano a un periodo de incubación de 24 horas. Por lo tanto, el 70% de las muestras de propóleo incrementaron su actividad luego de un tiempo de incubación de 48 horas, en relación con el efecto detectado a las 24 horas; en comparación a este estudio las tres concentraciones 25%, 50% y 75% presentaron efecto antibacteriano.

Según el estudio de Ayala C., Castillo E. y Mejía L. determinaron que el enjuague bucal a base de propóleo puro tiene mayor promedio de halo de inhibición en relación a las diluciones 1:2, y 1:4 con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El enjuague bucal elaborado a base de propóleo peruano, tiene calidad farmacéutica y efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Streptococcus mutans*.

CONCLUSIONES

- 1 Se logró comprobar que existe efecto antibacteriano, por método de difusión Kirby Bauer demostrando que el extracto etanólico de propóleo presenta efecto antibacteriano in vitro frente a la bacteria ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175. (25% = 17.583 ± 2.577 mm; 50% = $16.905 \pm 1,891$ mm; 75% = $16,881 \pm 2,013$ mm) ($p < 0,05$).
- 2 El efecto antibacteriano para la clorhexidina al 0,12% tuvo una formación de halo de ($24,543 \pm 2,486$ mm) sobre la bacteria ***Streptococcus mutans*** ATCC 25175, es decir la clorhexidina al 0,12% es mejor.
- 3 Se logró comparar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo demostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (25% = 17.5831 ± 2.5773 mm; 50% = $16.9050 \pm 1,8918$ mm; 75% = $16,8813 \pm 2,0137$ mm); sin embargo estos resultados fueron menores al ser comparados con CHX al 0,12% ($24,5438 \pm 2,4869$ mm).

RECOMENDACIONES

- 1 Habiéndose demostrado el efecto antibacteriano del propóleo se recomienda su promoción, uso y elaboración de recetas farmacéuticas de carácter odontológico que incorporen componentes naturales en razón a sus propiedades antibacterianas.
- 2 Fomentar el uso de productos naturales según los resultados obtenidos
- 3 Recomendar el uso del propóleo por ser un producto natural de fácil acceso ya que gracias a este trabajo de investigación se demostró su efecto antibacteriano muy semejante a la clorhexidina.
- 4 Proponer hacer análisis de Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida para complementar este estudio.
- 5 Potenciar el estudio y pruebas para su posterior uso en colutorios, pastas dentales y goma de mascar con evaluación in vitro.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. Trends in Microbiology. 1 de febrero de 2015;23(2):76-82.[citado 09 de junio de 2019]. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966842X\(14\)00225X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X1400225X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966842X(14)00225X?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X1400225X%3Fshowall%3Dtrue)
2. Oral and Systemic Effects of Xylitol Consumption - FullText - Caries Research 2019, Vol. 53, No. 5 - Karger Publishers [Internet]. [citado 31 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/FullText/499194>
3. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. Streptococcus mutans and dental caries. CES Odontol [Internet]. enero de 2013 [citado 21 de mayo de 2019];26(1):44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en&nrm=iso&tlng=es
4. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of Compounds Found in Propolis on Streptococcus mutans Growth and on Glucosyltransferase Activity. Antimicrob Agents Chemother. mayo de 2002;46(5):1302-9. [citado 21 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC127145/>
5. Mayta-Tovalino F, Contreras SS, Calle JC, Mallqui JA. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. Revista Estomatológica Herediana. 1 de julio de 2014;22(1):50. [citado 27 de Junio de 2019]. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/view/159/133>

6. Uso del Propóleo en odontología [Internet]. [citado 8 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art-23/>
7. Peña RC. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Cienc E Investig Agrar. abril de 2008;35(1):17-26. [citado 8 de junio de 2019]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202008000100002
8. Definición Propóleo | Propoleos [Internet]. [citado 21 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://www.propoleos.es/propoleo/definicion-propoleo.html>
9. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco [Internet]. [citado 31 de mayo de 2020]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322015000200006
10. Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li GQ, Hu F-L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. Molecules. 26 de noviembre de 2014;19(12):19610-32. [citado 31 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6271758/>
11. Mayta T., SacsquispeC. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Rev Estomatol Herediana. 22 de agosto de 2014;20(1):19. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/view/1777>

12. Nakata HM. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. 1. 2007;10(2):18-20. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/3028>

13. Jara C., Saavedra E., Mejía L, Luján J, Ayala L. Propoleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana. 14 de junio de 2016;23(1):171-184-184. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/view/240/210>

14. Huaytalla Alemán RM, Gálvez Ramírez CM, Carhuapoma-Yance M, Alvarez-Paucar MA, López Guerra S. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. Rev Estomatol Herediana. 11 de abril de 2018;28(1):36. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101943552018000100005

15. Airen B, Sarkar PA, Tomar U, Bishen KA. Antibacterial effect of propolis derived from tribal region on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*: An in vitro study - J Indian Soc Pedod Prev Dent [Internet]. [citado 2 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.jisppd.com/article.asp?issn=09704388;year=2018;volume=36;issue=1;spage=48;epage=52;aulast=Airen>

16. Maria D. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra *Streptococcus mutans*. 09 Junio de 2015. [Internet]. [citado 15 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4573/1/T-UCE-0015154.pdf>

17. Moreno Huertas Z, Martínez P. Efecto antimicrobiano In vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. 2016 feb.[Internet]. [citado 07 de julio de 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/294457243_Efecto_antimicrob

obiano_In_vitro_de_propoleos_argentinos_colombianos_y_cubano_sobre_Streptococcus_mutans_ATCC_25175

18. Jara CIA, Saavedra EFC, Mejía LG, Luján JC, Ayala LES. Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana. 2016;14. [citado 07 de julio de 2020]. Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/viewFile/240/210>
19. Núñez DP, García Bacallao L. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas. junio de 2010;9(2):156-66. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729519X201000200004
20. Janket S., Benwait J, Isaac P, Ackerson L. Oral and Systemic Effects of Xylitol Consumption. Caries Res. 2019;53(5):491-501. [Citado 19 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/Pdf/499194>
21. Bonetti D, Clarkson JE. Fluoride Varnish for Caries Prevention: Efficacy and Implementation. Caries Res. 2016;50(Suppl. 1):45-9. [Citado 19 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.karger.com/Article/FullText/444268>
22. Kidd E, Fejerskov O. Essentials of dental caries, fourth edition. 2016;6. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/327945089_ESSENTIALS_OF_DENTAL_CARIES_FOURTH_EDITION
23. Siquero V., Mattos V. Factores de riesgo asociados a caries de infancia temprana severa. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Departamento Académico de Estomatología Preventiva y Social. Lima, Perú. 30 de septiembre de 2018;15(3):146-53. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2018/1406-4675-1-PB.pdf>

24. Duque de Estrada R., Pérez Q., Hidalgo G.I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Revista Cubana de Estomatología. marzo de 2006;43(1):0-0. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072006000100007
25. Repositorio Digital: Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo Ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra streptococcus mutans [Internet]. [citado 31 de mayo de 2020]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/4573>
26. Etimología Propóleo | Propoleos [Internet]. [citado 4 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.propoleos.es/propoleo/etimologia-propoleo.html>
27. López N, Aymar J, Raquel M, Natalia M. Utilización del propóleo en Odontología. :4. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ateneo-odontologia.org.ar/articulos/lv02/articulo2.pdf>
28. Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, et al. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus. Braz J Microbiol. 30 de octubre de 2013;44(2):577-85. [citado 27 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833163/>
29. Padrón G., Naranjo A, Díaz J, Llera R. El propóleo una alternativa de todos los tiempos. 10 de enero de 2019. [Citado 13 de septiembre de 2019]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/330289548_El_propoleo_una_alternativa_de_todos_los_tiempos

30. Chaillou LL, Herrera HA, Maidana JF. Estudio del propoleos de Santiago del Estero, Argentina. Food Sci Technol. marzo de 2004;24(1):11-5. [Citado 13 de septiembre de 2019]. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010120612004000100003&script=sci_arttext

31. Mayta-Tovalino F, Contreras SS, Calle JC, Mallqui JA. Propóleo Peruano:Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. Rev Estomatológica Hered. 1 de julio de 2014;22(1):50. [Citado 13 de septiembre de 2019]. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/view/159>

32. Ficha estandar de familia del catalogo de bienes, servivios y obras del MEF. [Internet]. [citado 3 de junio de 2019]. Disponible en: https://www.mef.gob.pe/contenidos/doc_siga/catalogo/ctlogo_MEF_DIGEMID_clorhexidina.pdf

ANEXOS

ANEXO 1. INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

TABLA DE RESULTADOS

TABLA DE RESULTADOS												
N° DE PLACA	EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÉLEO									GRUPO CONTROL		
	25%			50%			75%			G. DE CLORHEXIDINA		
	Halos mm		Promedio final	Halos mm		Promedio final	Halos mm		Promedio final	Halos mm		Promedio final
	1era medida	2da medida		1era medida	2da medida		1era medida	2da medida		1era medida	2da medida	
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												

TABLA DE RESULTADOS												
N° DE PLACA	EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO									GRUPO CONTROL		
	25%			50%			75%			G. DE CLORHEXIDINA		
	Halos mm		Promedio	Halos mm		Promedio	Halos mm		Promedio	Halos mm		Promedio
	1era medida	2da medida	final	1era medida	2da medida	final	1era medida	2da medida	final	1era medida	2da medida	final
1	19.38mm	19.38mm	19.38mm	16.58mm	16.58mm	16.58mm	16.21mm	16.21mm	16.21mm	28.18mm	28.18mm	28.18mm
2	11.65mm	11.60mm	11.625mm	14.36mm	14.34mm	14.35mm	15.75mm	15.75mm	15.75mm	26.18mm	26.18mm	26.18mm
3	17.65mm	17.65mm	17.65mm	16.74mm	16.74mm	16.74mm	17.21mm	17.23mm	17.22mm	21.26mm	21.24mm	21.25mm
4	17.12mm	17.14mm	17.13mm	18.04mm	18.04mm	18.04mm	14.65mm	14.65mm	14.65mm	23.85mm	23.85mm	23.85mm
5	18.29mm	18.29mm	18.29mm	14.79mm	14.81mm	14.80mm	17.97mm	17.95mm	17.96mm	26.21mm	26.21mm	26.21mm
6	17.74mm	17.72mm	17.73mm	20.41mm	20.41mm	20.41mm	14.49mm	14.49mm	14.49mm	26.19mm	26.19mm	26.19mm
7	19.10mm	19.10mm	19.10mm	17.51mm	17.53mm	17.52mm	18.35mm	18.35mm	18.35mm	22.33mm	22.31mm	22.32mm
8	19.76mm	19.76mm	19.76mm	16.80mm	16.80mm	16.80mm	20.42mm	20.42mm	20.42mm	22.17mm	22.17mm	22.17mm

ANEXO 2: FOTOGRAFÍAS DE LOS DISTINTOS PROCEDIMIENTOS REALIZADOS

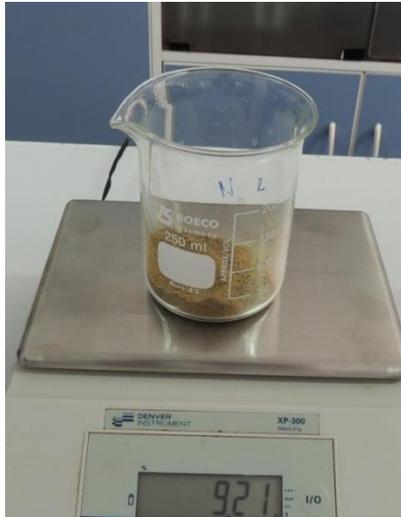
RECOLECCIÓN DEL PROPÓLEO



Figura N° 01: Pesado del propóleo con partículas e impurezas.

Figura N° 02: Pesado del propóleo sin partículas e impurezas.

PROCESAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO



FiguraN°03: Pesado del propóleo convertido en partículas pequeñas

FiguraN°04: Propóleo y alcohol previamente distribuidos.



Figura N° 05: Maceración y almacenamiento a 37°C



Figura N° 05 – 06: Proceso de filtración

Figura N° 07: Deshidratación a 59 °C en la estufa para extraer el etanol

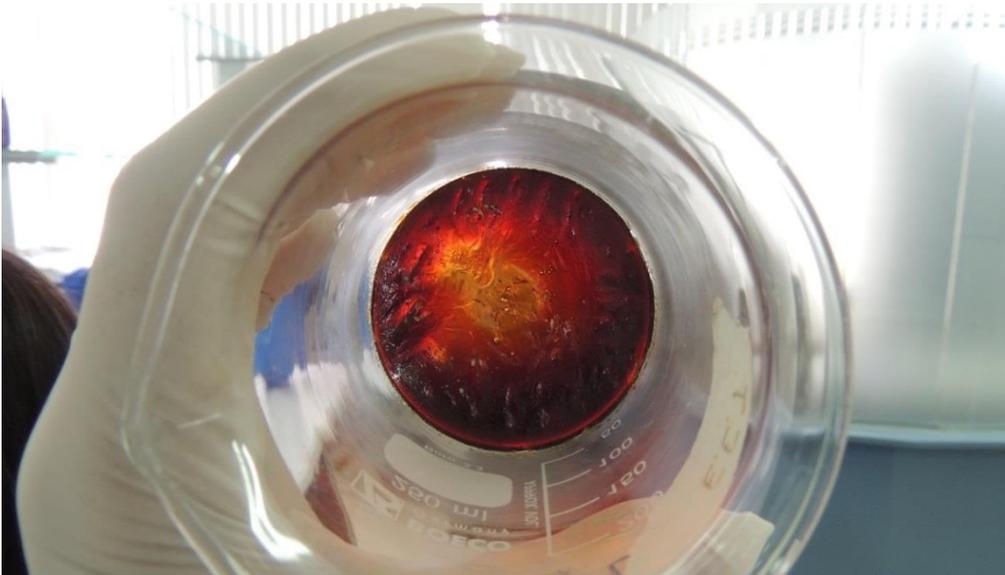


Figura N° 08: Producto final a la deshidratación

OBTENCIÓN DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO



Figura N° 09: Raspado y pesado del propóleo

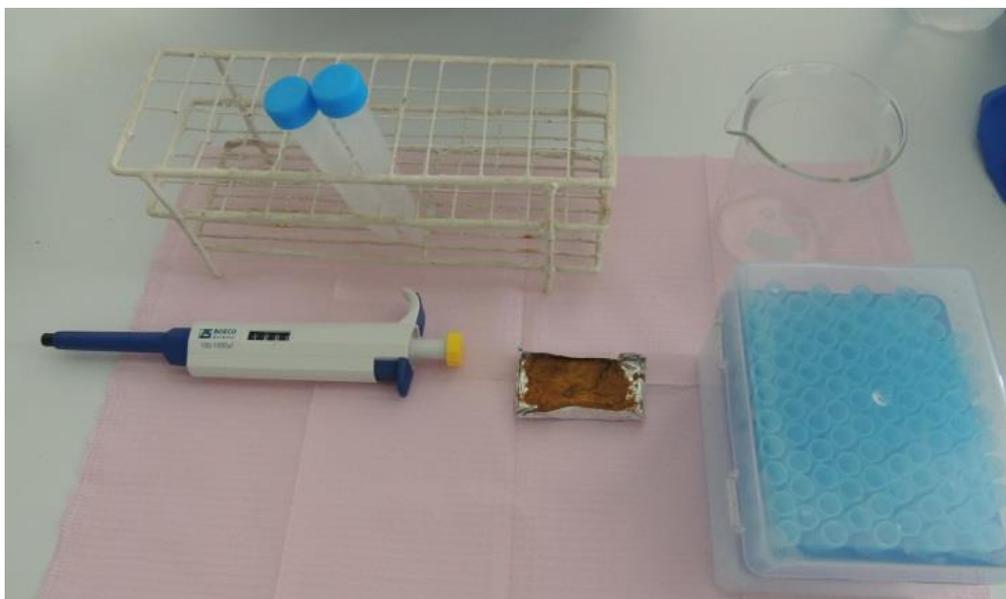


Figura N° 10: Materiales utilizados para realizar las concentraciones.

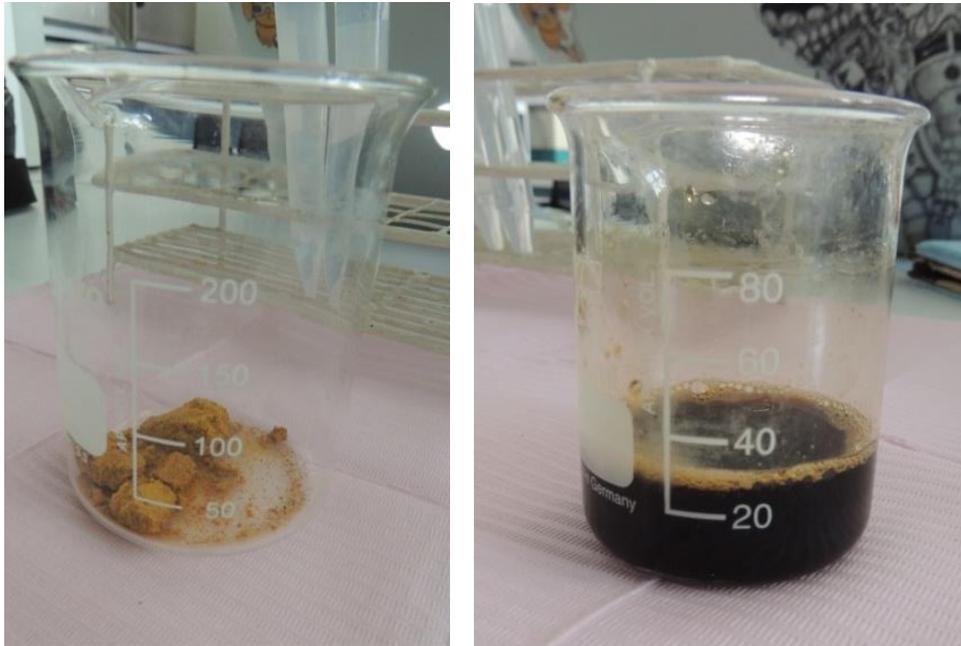


Figura N° 11 – 12: Obtención de las concentraciones.

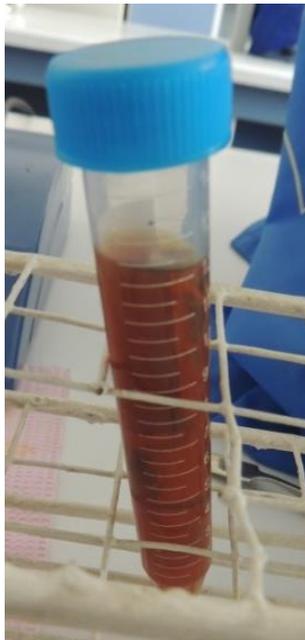


Figura N° 13: Extracto etanólico de propóleo.

**OBTENCIÓN DE LAS CEPAS EN ESTUDIO - *STREPTOCOCCUS
MUTANS* ATCC 25175**

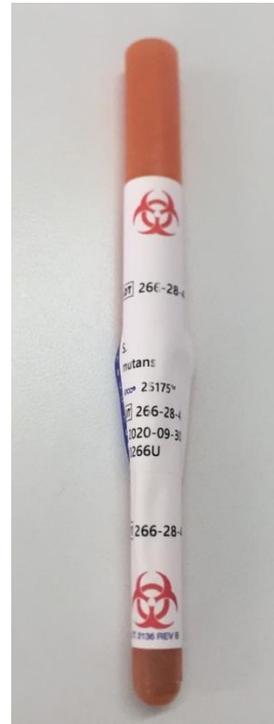
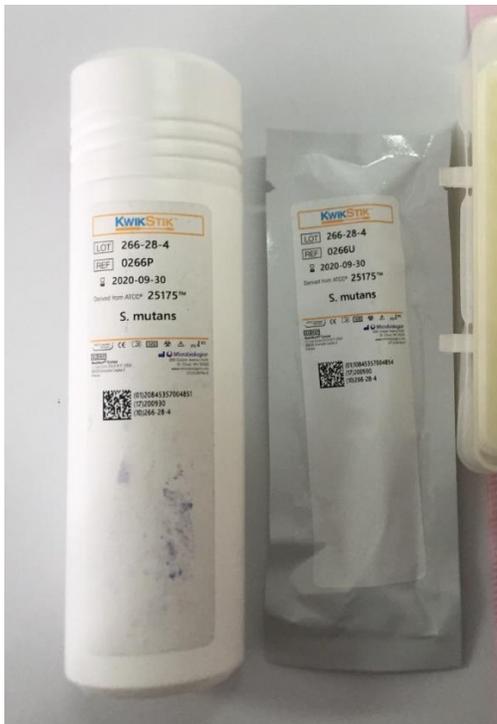


Figura N° 14 – 15 - 16: Materiales utilizados



Figura N° 17: Activación de la cepa

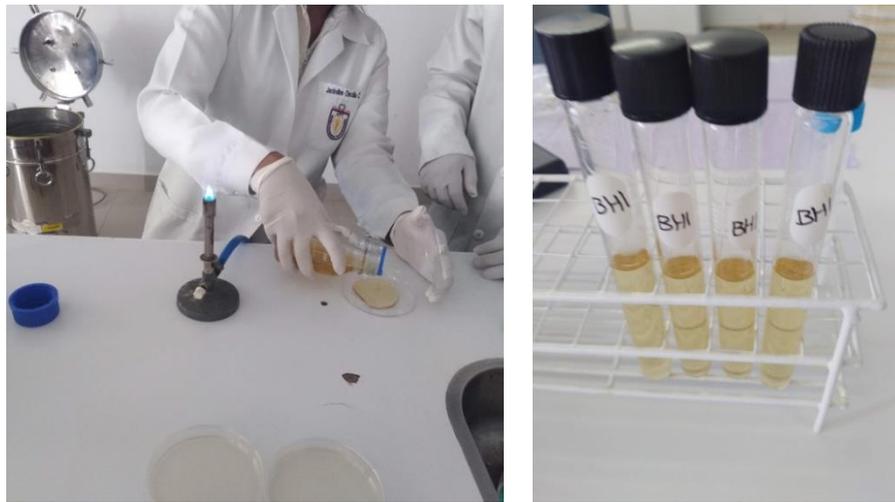


Figura N° 18: Preparación de las placas Petri.

Figura N° 19: Preparación del inóculo Bacteriano de *S. mutans* ATCC 25175.

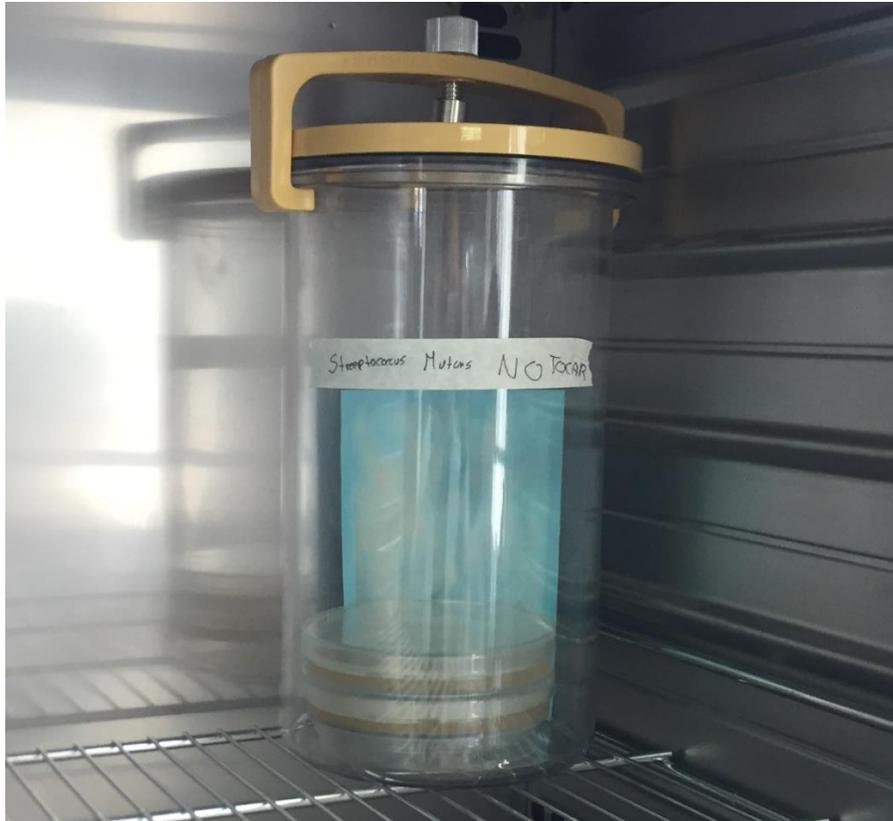


Figura N° 20: Incubación



Figura N° 21: Materiales utilizados para el hisopado y preparación de los discos.



Figura N° 22: Materiales utilizados para la preparación de los discos.



Figura N° 23 - 24: Hisopado de las placas Petri.



Figura N° 20: Dispensación de los discos de inhibición (embebidos con E.E. Propóleo) sobre las placas inoculadas.

RESULTADOS Y MEDICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO



Figura N° 21: Lectura.



Figura N° 22: Medición.

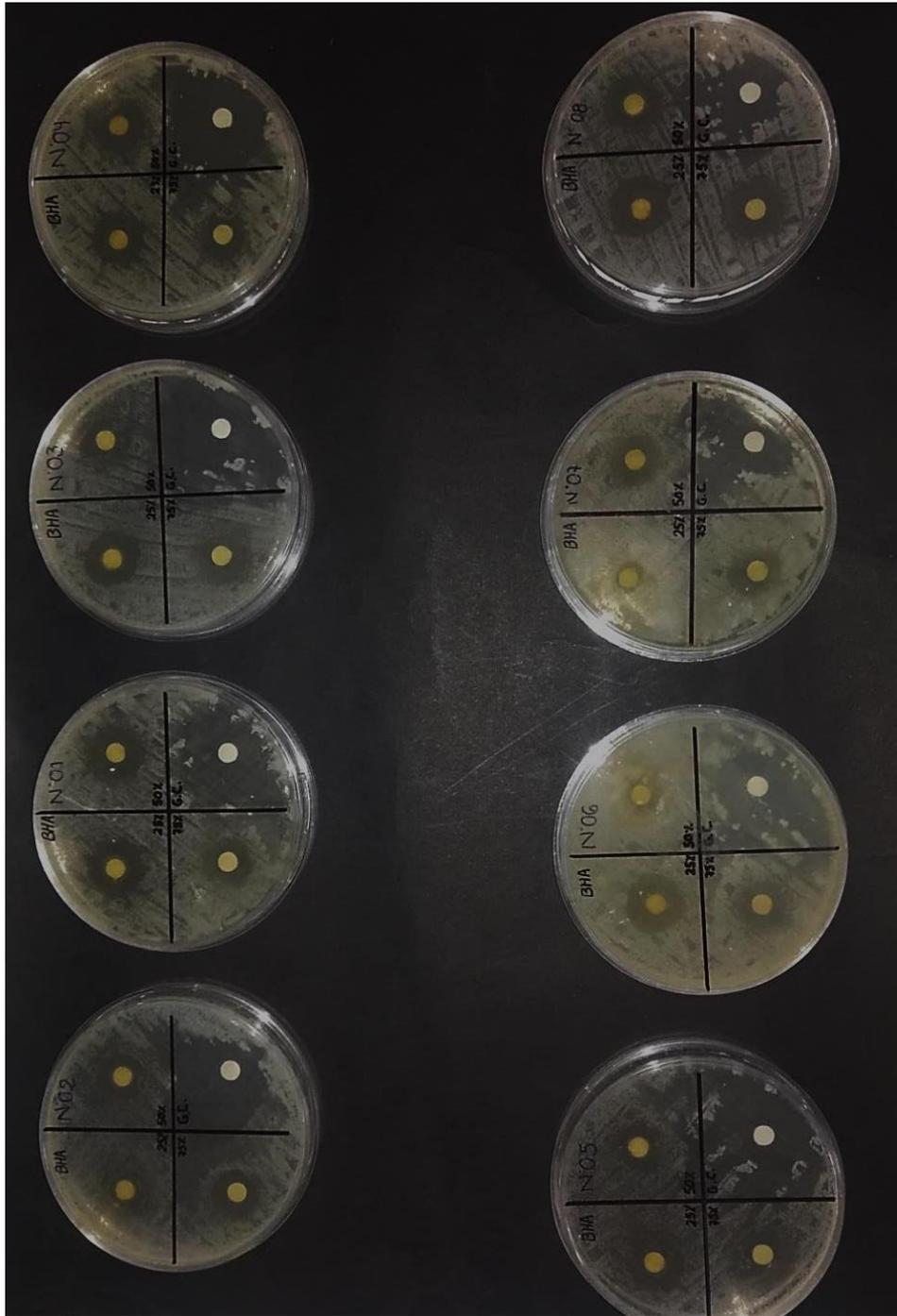


Figura N° 21: Resultados extracto etanólico de propóleo.

ANEXO 3



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO N° ANA07A20.004467

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del cliente : Jackeline Luciana Checalla Collatupa
Dirección del cliente : Urb. Santa María G-16 Arequipa
RUC : No corresponde
Identificación del contacto : Yesica Miriam Alvarez Choque
Descripción de la muestra : Extracto etanolico de la Propolio

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Tamaño de muestra : 5 mL
Fecha de recepción : 07/01/2020
Fecha de ejecución de ensayo : 07/01/2020 al 15/01/2020
Fecha de emisión de informe : 15/01/2020
Página : 1 de 2

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS Metodología thin layer chromatography (TLC)	Se determinó presencia de: terpenos, di terpenos, terpenoidales .

OBSERVACIONES:

- La información proporcionada por el cliente es de responsabilidad exclusiva del mismo.
- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento previo y transporte de la muestra hasta el ingreso al LECC son responsabilidad del solicitante y los resultados emitidos en el presente informe se refieren a la muestra tal como se recibió.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQPDA 00824
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



ANEXO 4



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERÚ



INFORME DE ENSAYO N° ANA07A20.004467

INFORMACIÓN PROPORCIONADA POR EL CLIENTE

Nombre del cliente : Jackeline Luciana Checalla Collatupa
Dirección del cliente : Urb. Santa María G-16 Arequipa
RUC : No corresponde
Identificación del contacto : Yesica Miriam Alvarez Choque
Descripción de la muestra : Extracto etanolico de la Propolio

INFORMACIÓN DEL ENSAYO

Condición del muestreo : Por el cliente
Tamaño de muestra : 5 mL
Fecha de recepción : 07/01/2020
Fecha de ejecución de ensayo : 07/01/2020 al 15/01/2020
Fecha de emisión de informe : 15/01/2020
Página : 2 de 2



DETERMINACIÓN GENERAL DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Fase Móvil: Acetato de etilo metanol agua (4:0,5: 0,40)
Revelador: Vainillina (1%) Ácido Sulfúrico (5%) 100 °C

