



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE LA MARCHA FITOQUÍMICA DE
TRES PROPÓLEOS PERUANOS, Y SU ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA FRENTE A CEPAS DE
STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175) Y
STREPTOCOCCUS ORALIS (ATCC 35037) TRUJILLO,
2016”**

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

AUTOR

VARGAS PAJARES, INGRID VANNESA

ASESOR

Mgtr. VASQUEZ PLASENCIA, CESAR ABRAHAM

TRUJILLO - PERÚ

2019

TITULO

**“EVALUACIÓN DE LA MARCHA FITOQUÍMICA DE TRES PROPÓLEOS
PERUANOS, Y SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A CEPAS DE
STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175) Y STREPTOCOCCUS ORALIS
(ATCC 35037) TRUJILLO, 2016”**

Grupo de trabajo:

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Ingrid Vannesa Vargas Pajares

ASESOR: Mgtr. Cesar Abraham Vásquez Plasencia

Firma del jurado y asesor

**Dr. ELIAS ERNESTO AGUIRRE SIANCAS
PRESIDENTE**

**Mgtr. EDWUAR RICHARD MORON CABRERA
MIEMBRO**

**Mgtr. JUAN LUIS PAIRAZAMAN GARCIA
MIEMBRO**

**Mgtr. CESAR ABRAHAM VASQUEZ PLASENCIA
ASESOR**

AGRADECIMIENTO

A Dios, por a verme guiado a lo largo de mi carrera, por darme la fortaleza para que fuera posible alcanzar este triunfo.

A mis padres, por el apoyo incondicional que siempre recibo, por todos los sacrificios que hicieron a lo largo de esta carrera.

A mis hermanos, por su cariño, apoyo y comprensión.

A mis asesores Mg Cesar Vásquez y Mg. Pablo Millones, por su paciencia, dedicación a nunca negarse a atenderme y trasmitirme sus diversos conocimientos para que este trabajo sea un éxito.

DEDICATORIA

A mi madre Marina Pajares, por darme la vida, creer en mí, estar junto a mi cuando la necesito y por apoyarme siempre. Gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

Al amor de mi vida por sus palabras y confianza, por no haber dejado que me rinda en ningún momento e iluminarme a salir adelante.

A mi hijo el motor y motivo de mi vida.

Resumen

Muchos estudios han tratado de identificar los agentes antibacterianos a partir de extractos naturales, y uno de estos agentes más estudiados es el propóleo; sustancia resinosa que recogen las abejas a partir de diferentes especies vegetales, se considera como una alternativa en el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas por su amplia gama de actividad antimicrobiana. El objetivo del estudio fue evaluar la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su efecto antibacteriano frente a cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *S. oralis* ATCC 35037. Para este estudio se tomó muestras de propóleo en Arequipa, Huánuco y Huaraz, para realizar extractos en distintas concentraciones obtenidas a partir de máxima solubilidad para ser enfrentadas con las cepas de *S. mutans* y *S. oralis* mediante la técnica de pocillos para medir halos de inhibición. En el estudio se realizó la marcha fitoquímica y conteo de polifenoles totales. Se demostró que el extracto etanólico de propóleo de Arequipa al 10% presentó mayor efecto antibacteriano sobre *S. mutans* y *S. oralis* y además sus tres concentraciones (10%, 5% ,25%) tuvieron mayor efecto que las concentraciones de Huánuco y Huaraz. Existe relación entre la concentración de polifenoles y efecto antibacteriano, a mayor concentración mayor es el efecto. Todas las concentraciones del propóleo recolectado en Arequipa tienen un efecto antibacteriano sobre *S. mutans* al igual que los propóleos recolectados en Huánuco al 2% y Huaraz al 5%.

Palabras claves: Propoleo, *S. mutans* , *S. oralis* , polifenoles

Summary

Many studies have tried to identify antimicrobial agents from natural extracts, and one of these most studied antibacterial agents is propolis; Resinous substance collected by bees from different plant species, is considered as an alternative in the treatment and prevention of infectious diseases because of its wide range of antimicrobial activity. The objective of the present study was to evaluate the phytochemical march of three Peruvian propolis and their antimicrobial effect against strains of *S. mutans* ATCC 25175 and *S. oralis* ATCC 35037. For this study, samples of propolis were taken in Arequipa, Huanuco and Huaraz, which were masked by a person outside the project with the letters A, B and C; they were taken to the Pharmacy and Biochemistry laboratory to make the extracts in different concentrations obtained from maximum solubility to be faced with the strains of *S Mutans* and *S Oralis* mediante the technique of wells to measure the inhibition halo. In the study, the phytochemical march and counting of total polyphenols were carried out. The results showed that the ethanol extract of propoleo of Arequipa to 10% presented greater antibacterial effect on *E. Mutans* and *E. Oralis*. Their three concentrations (10%, 5%, 25%) had greater effect than the concentrations of Huánuco and Huaraz . There is a relationship between the concentration of polyphenols and antibacterial effect, the higher the concentration, the greater the effect. All the concentrations of propolis collected in Arequipa have an antibacterial effect on *S. Mutans* as well as the propoleos collected in Huánuco at 2% and Huaraz at 5%.

Keywords: Propolis, *S. Mutans*, *S Oralis*, polyphenols

CONTENIDO

1. Título de la tesis	ii
2. Equipo de trabajo	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor	iv
4. Agradecimiento.....	v
5. Dedicatoria.....	vi
6. Resumen.....	vii
7. Abstract.....	viii
8. Contenido.....	ix
9. Índice de tablas	x
10. Índice de gráficos	xi
I. Introducción.....	1
II. Revisión de la literatura	3
III. Hipótesis.....	15
IV. Metodología.....	15
4.1. Diseño de la investigación	15
4.2. Población y muestra	15
4.3. Definición y operacionalización de variables	16
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	18
4.5. Plan de análisis.....	42
4.6. Matriz de consistencia.....	43
4.7. Principios éticos	45
V. Resultados.....	46
5.1 Resultados	46
5.2. Análisis de resultados	50
VI. Conclusiones	53
Aspectos complementarios.	54
Referencias bibliográficas.....	55
Anexo.....	64

INDICE DE TABLAS

Tabla 1

Caracterización fitoquímica de tres propóleos peruanos.....46

Tabla 2

Actividad antibacteriana de tres propóleos peruanos sobre Streptococcus mutans y Streptococcus oralis..... 47

Tabla 3

Evaluación del efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos, etanol y clorhexidina, frente a cepas de Streptococcus mutans y Streptococcus oralis.....48

Tabla 4

Correlación de polifenoles y la actividad antibacteriana de tres propóleos peruanos sobre cepas Streptococcus mutans y Streptococcus oralis 49

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1

Efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas Streptococcus mutans..... **70**

Grafico 2

Efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas Streptococcus oralis **71**

Grafico 3

Correlación de polifenoles y el efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas Streptococcus mutans y Streptococcus oralis **72**

Grafico 4

Comparación in vitro la actividad antibacteriana entre las concentraciones de tres propóleos peruanos, etanol al 70 % y clorhexidina sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Streptococcus oralis (ATCC 35037) **73**

I. Introducción

En la Estomatología una de las enfermedades que más encontramos dentro de la cavidad oral es la caries dental, la cual es una enfermedad infecciosa, multifactorial en donde la dieta, infección microbiana, y respuesta del huésped juegan un papel importante.¹ Pero para dar inicio a esta enfermedad es necesaria la formación de la placa dental, la cual se conceptualiza como una comunidad microbiana que se encuentra sobre la superficie del diente, formando una biopelícula embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival.² Dentro de esta placa dental, como iniciadores potenciales para su formación se encuentran las bacterias del género *Streptococcus*, con sus especies *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*².

Streptococcus mutans, es una bacteria anaerobia facultativa que está comúnmente en la cavidad oral y es un principal contribuyente a la caries dental causada por la formación de biopelículas.³ Es considerado como el microorganismo más cariogénico entre los estreptococos orales. *Streptococcus oralis*, son considerados como los principales primeros colonizadores de biofilms dentales, e inician la formación de biofilm por interactuar directamente con la película salival que está presente en las superficies orales.^{4, 5}

En los últimos años el dilema del uso de los antibióticos como agentes antimicrobianos es debido al potencial de resistencia a ellos, por lo tanto, muchos estudios han tratado de identificar los agentes antimicrobianos a partir de extractos naturales, y uno de estos agentes antibacterianos más estudiados es el propóleo.³

El propóleo es una sustancia resinosa que recogen las abejas a partir de diferentes especies vegetales, siendo sus principales componentes los flavonoides y

ácidos fenólicos. Se considera como una alternativa en el tratamiento y prevención de muchas enfermedades infecciosas, ya que muestra una amplia gama de actividad antimicrobiana contra una variedad de bacterias, hongos, parásitos y virus.¹

La aplicación de propóleos contra un amplio espectro de bacterias orales puede ser beneficioso para mejorar la salud oral. Además, los estudios actuales informan que el uso de preparaciones estandarizadas de propóleo es seguro y menos tóxico que muchos otros fármacos sintéticos, sin embargo, la composición química del propóleo varía en función de los cambios regionales, de temporada y de vegetación.⁶

El objetivo de este trabajo fue evaluar la caracterización fito-química de tres propóleos peruanos y su efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*. Este trabajo tiene gran importancia dentro de la odontología actual, sabiendo que hay muchos estudios sobre el efecto antibacteriano del propóleo peruano, debemos considerar que la composición química de este varía en función a los cambios regionales, de temporada y vegetación de la que es recogida por las abejas, es por eso que este proyecto busco evaluar los componentes de estos tres extractos de propóleos para poder identificar las características fotoquímicas que podría ser mejor que los otros en relación a su efecto antibacteriano ante bacterias que son colonizadores primarios de la formación de la placa dental como los *S. mutans* y *S. oralis*, brindando a la odontología peruana una posible opción de medicamento seguro y menos tóxicos que muchos otros fármacos. La metodología fue de tipo cuantitativo, de nivel aplicativo, de diseño experimental, prospectivo y analítico. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de propóleo de Arequipa al 10% presentó mayor efecto antibacteriano sobre *S. mutans* y *E. Oralis*. Sus tres concentraciones (10%,5%,25%) tuvieron mayor efecto que las concentraciones de Huánuco y Huaraz.

Existe relación entre la concentración de polifenoles y efecto antibacteriano, a mayor concentración mayor es el efecto. Todas las concentraciones del propóleo recolectado en Arequipa, Huánuco al 2% y Huaraz al 5 % tienen un efecto antibacteriano sobre *S. Mutans*.

II. REVISION DE LITERATURA

Antecedentes:

Ramírez et. al.⁷ (Peru, 2016). Efecto inhibitorio del extracto de propóleo sobre los microorganismos *Streptococcus mutans* y *Cándida albicans* que colonizan la cavidad oral en pacientes adultos de la clínica odontológica, UNA Puno – 2016. Determinaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo al 25%, 50%, 75% y 100%, sobre cepas de *Streptococcus mutans* de pacientes con caries dental activa, para lo cual midieron el halo de inhibición. Los resultados mostraron un halo de 14.25mm para la concentración de 100%, al 75% 11.7mm, al 50% 10.5mm y al 25% 7.5 mm. Lo que les llevo a concluir que a mayor concentración mayor actividad inhibitoria frente a *S. mutans*.

Huayhua et. al.⁸ (Peru,2009). Acción antimicrobiana del própolis de *Apis mellifera* y de *Salanum mammosum* (teta de vaca) contra microorganismos de la cavidad oral (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis*). Evaluaron las propiedades antimicrobianas del propóleo sobre cepas de *Streptococcus* aplicando el propóleo de al 5 % y 10 %, empleando como control la amoxicilina. Los resultados fueron expresados en mm obtenido de las medidas de los halos de inhibición; se observó que el propóleo al 10% tiene un mayor efecto frente a *S. mutans* con un halo de 24 mm, por otro lado, el extracto al 5 % mostró un halo de 20mm mientras que la

amoxicilina un halo de 21mm; por lo que concluyeron que es buena opción elaborar pastas dentales con propóleo al 10%.

Eguizábal et. al.⁹ (Peru, 2007). 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 de Oxapampa frente a *Streptococcus mutans* a través de la medida de los halos de inhibición formado, empleando como control la clorhexidina al 0,12 % y alcohol al 70 %. Los resultados mostraron mayor efecto inhibitorio contra *S. mutans* para todos los extractos de propóleos en comparación con los controles; dando 13,56 mm para el 0,8%; 12,00 mm el 20% y 12,33 para el 30 %, asimismo 11,72 para la clorhexidina y 9,61 para el alcohol respectivamente. Esto les permitió concluir que a menor concentración de propóleo hay un mayor efecto antimicrobiano.

Soto,¹⁰ (Peru,2015). 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 según el método de Olga Lock 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 catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, antocianidinas, flavonoides, fenoles y taninos en todos los extractos, asimismo la presencia de alcaloides solo en Piura, saponinas en Pucallpa y quinonas en Piura y Ayacucho concluyendo que debido a las diferencias significativas de región a región sustenta que existe la necesidad de estandarizar los tipos de propóles en Perú.

El-Tabakh ¹¹ (Egipto, 2010) Efecto del propóleo y el veneno de abeja sobre la cultura bacteriana aislada de pacientes con conjuntivitis. Evaluó el efecto antibacteriano del extracto de propoleo en bacterias que causan la conjuntivitis entre ellas *Streptococcus oralis* a través de difusión de pozos de agar mostrando la actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas mostrando un halo de inhibición para *S. oralis* de 22 mm, *Staphylococcus albus* 26 mm, *Staphylococcus aureus* 23 mm, *Streptococcus pyogenes* 20 mm, *Streptococcus pneumoniae* 19 mm, *Corynebacterium xerosis* 13 mm, *Proteus vulgaris* 20 mm, *Haemophilus aegyptius* 18 mm, *Haemophilus influenzae* 16 mm, *Neisseria catarrhalis* 13 mm, *Escherichia coli* y *Moraxella catarrhalis* 8 mm, *Klebsiella pneumoniae* 7 mm y *Pseudomonas aeruginosa* 3 mm. Por lo que concluyeron que extracto de propoleo puede ser usado para el tratamiento de conjuntivitis.

Samara-Ortega et al ¹² (Colombia, 2010). Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. Su propósito fue evaluar la actividad antimicrobiana de dos extractos etanólicos de Propóleo (EEP) provenientes de apiarios de los municipios de Totoró y Buenos Aires en el Departamento del Cauca, frente a una bacteria Gram positiva y otra Gram negativa y se determinó la composición cualitativa de metabolitos secundarios de los dos extractos. La actividad bactericida se evaluó por el método de dilución en caldo y el análisis químico se realizó mediante pruebas de reacciones coloridas, cromatografía bidimensional y cromatografía de capa delgada. Se concluyó que ambos extractos de propóleo mostraron efecto bactericida, donde el Propóleo de Buenos Aires fue más efectivo que el de Totoró frente a *Pseudomonas aeruginosa*, al inhibir su crecimiento a una concentración inferior ($p < 0,05$), mientras que para

Staphylococcus aureus el análisis no arrojó diferencias significativas ($p>0,05$) entre los dos extractos

Mayta-Tovalino et al ¹³ (Peru, 2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Staphylococcus aureus (ATCC 25923). Su objetivo fue demostrar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo (EEP) de Oxapampa-Perú evaluando in vitro su acción antibacteriana frente al S. mutans y S. aureus para enfrentarlas a las soluciones: Propóleo 10% y 30% y compararlas con los testigos clorhexidina 0,12 y 0,05%, listerine® y agua destilada. Se evaluó la actividad antimicrobiana mediante el método de Kirby-Bauer. El diseño del estudio fue de tipo experimental in vitro y el tamaño muestral fue 16. Para el análisis de los datos se utilizó la prueba t de Student. Se determinó que para el S. aureus, el EEP al 30% presentó mayor eficacia con una media de $11,77\text{mm}\pm 0,19$ y se encontró que las dos concentraciones de propóleo a las 24 y 48 horas mostraron diferencia significativa $p=0,007$. Además, se determinó que para el S. mutans, tanto el EEP al 10% y 30% a las 24 y 48 horas no mostraron diferencia significativa. Por lo tanto el EEP al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano que el Listerine® contra el S. mutans $p<0,001$ e igual en efectividad que la clorhexidina 0,05% frente al S. aureus.

Bases teóricas de la investigación

Propóleo

Concepto

El propóleo una resina cerosa de consistencia viscosa elaborada por las abejas a partir de exudados de árboles y la mezcla de la saliva de estas. La palabra propóleo

deriva del griego pro “defensa” y polis “comunidad o ciudad” es decir en defensa de la ciudad, ya que este producto se utiliza para la construcción, reparación, y protección. Las abejas la elaboran con la finalidad de sellar las grietas en sus panales para proteger a sus colmenas de agentes extraños.^{15, 16,17}

Composición

El propóleo en su composición 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 estudios mostraron que su composición química es variable e incluso difícil de estandarizar debido a que depende de muchos factores como: la vegetación, raza de las abejas, método de recolección y la estación o clima en la que se recolecta.^{16,18.}

Los propóleos están compuestos por resinas (40%), ceras (23-30%), polifenoles (14-16%), polisacáridos (2,5%), materias volátiles (> 10%), y otras sustancias^{16.}

Uso del propóleo a través del tiempo

Existen evidencias que datan de años A. C sobre el uso del propóleo para fines medicinales. Los antiguos Egipcios utilizaban el propóleo como anti-putrefacto para embalsamar a sus momias con el fin de conservarlos; en la cultura griega y romana se utilizaba como agente antiséptico y cicatrizante. Los Incas utilizaban el propóleo como un antipirético. En el siglo XVII fue vendida en las farmacias de Londres nombrado oficialmente como medicina por su alta efectividad antimicrobiana^{18,19.}

En la actualidad algunas culturas de los países de Europa lo utilizan para tratar enfermedades como asma bronquial, rinitis crónica, faringitis y tuberculosis. La administración de propóleos se ha mantenido durante mucho tiempo hasta llegar a

nuestros tiempos, se siguen realizando estudios sobre preparados a base de propóleo en campos de biología y medicina humana.^{20, 19,21.}

Colecta del propóleo por las abejas

El género *Apis* recolector o *Apis mellifera*, se encontró extendida en Europa, Asia y África. Estudios han demostrado que se según la especie que sea la abeja afecta a la actividad antibacteriana de propóleo debido a que cada especie tiene una botánica diferente.^{21.}

Las abejas fraccionan los pedazos de exudados resinosos de las plantas, con ayuda de mandíbula y patas, para luego humedecer con la lengua y modelarlas en pelotas en la mandíbula; posteriormente ponen las pelotas en sus patas traseras, que son utilizadas para llevar el polen y resinas, cuando las patas traseras están llenas, el propóleo es transportado al interior de la colmena y es depositado en las paredes inferiores, permanecen allí de una a 10 horas, hasta ser removido por otras abejas. Las abejas colectoras de propóleo no la manipulan en la colmena, de ello se encarga las abejas viejas que tienen las glándulas atrofiadas y se tienen la función almacenar y cerrar las grietas.^{33.}

Recolección

La recolección de propóleos es muy variable por el clima, debido a que según la estación en la que se encuentra la flora cambia y esta afecta la producción y funcionamiento de las abejas y por consecuencia la actividad biológica del propóleo e incluso se cree que produce cambios en el flujo de genes desde los cultivos a la maleza produciendo un cambio en la composición que como consecuencia afectaría su actividad biológica.^{22, 23,24.}

Métodos de recolección:

Básicamente existe dos métodos de recolección, mallas sumergidas y el raspado. El empleo de mallas plásticas permite una cosecha más limpia con menores impurezas. El raspado con espátula metálica es la técnica más se emplea, pero estudios han indicado que el contacto del propóleo con metal podría alterar y contaminar sus composiciones; por esto se han ido incorporado nuevas técnicas como raspado con espátula plástica, mallas Apifey y mallas tipo mosquitero²⁵.

Características organolépticas

- Aspecto: Esferas, granos, briquetas. Existe una estrecha relación con el método de cosecha empleado.
- Estructura: Espesa, no homogénea, presencia de impurezas mecánicas y de cera, el cual depende del método de cosecha, pero no debe ser excesivo.
- Color: Verde oscuro, amarillo, amarillo-verdoso, pardo, pardorrojizo, pardo oscuro, hasta negro.
- Consistencia: A temperaturas superiores a 300 C es blando y menores de 150 C duro y quebradizo.
- Olor: Resinoso, aromático, denota la presencia de aceites esenciales y miel en el producto. Pero también existen Propóleos que no tienen olor.
- Sabor: Generalmente amargo, picante e insípido en raras ocasiones.³³

En cuanto a sus características físicas, el propóleo se presenta como un producto sólido, su punto de fusión oscila desde 590 C hasta 70 u 800 C. Presenta una baja solubilidad en agua, pero puede ser diluido en solventes como alcohol etílico, acetona, propilenglicos, benceno y soda cáustica; siendo el alcohol etílico el solvente

más recomendado ya que permite extraer con más eficiencia los principios activos y bajas concentraciones de cera.^{15, 16,17}

Composición química

La composición de los propóleos es muy variable, dependerá tanto de la vegetación que se encuentre alrededor de la colmena, clima, época del año, así como la especie de la abeja que recolecto.¹⁸

Flavonoides:

Los flavonoides es el componente principal del propóleo debido a que es el encargado de potenciar su actividad biológica ya que poseen un efecto antibacteriano, antiviral y antiinflamatorio. Donde dentro de su estructura se encuentra las flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianidinas e isoflavonas^{26, 27,28,29.}

Terpenoides:

Son componentes esenciales porque contribuye a sus actividades antioxidantes y antimicrobianas gracias a estos poseen el peculiar olor resinoso; están compuestos de monocíclico, acíclico, monoterpenos dicíclicos y derivados.^{15.}

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^{15.}

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 contribuye a la actividad antimicrobiana del propóleo.^{15, 16.}

Otros

Azúcares: Se cree que provienen de glucosa, fructosa y sacarosa de las plantas; otros refieren que provienen de glucósidos flavonoides hidrolizados en el propóleo.

Hidrocarburos:

Son componentes básicos del propóleo; se ha identificado, alcanos, alquenos, alcadienos, monoésteres, diésteres, ésteres aromáticos, ácidos grasos y esteroides en diferentes propóleos.^{15,16.}

Minerales: Según Shuai et. al. Estos se clasifican en:^{15.}

- a. **No Tóxico:** Aquellos que no producen ningún daño al organismo humano como: Ca, K, Mg, Na, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr y Zn.
- b. **Tóxicos:** Aquellos que producen daño al organismo humano como: Arsénico, cadmio, mercurio y plomo.

Actividad biológica

Los propóleos poseen múltiples actividades biológicas atribuidas a sus distintos componentes quienes le dan una potente actividad antiviral, antifúngico, antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, inmunomodulador y sobre todo antibacteriano^{15, 16, 17.}

- **Actividad bacteriana**

Es la mayormente estudiada ya que distintos propóleos han mostrado ser eficaces en bacterias Gram tanto positivas como negativas, el primer estudio de esta propiedad es en 1948 por Kivalkina^{22, 32, 33.}

Asimismo, en odontología diversos estudios han mostrado su eficacia frente a *S. mutans* bacteria que coloniza primero para formar el biofilm cariológico; mostrando su alta capacidad de inhibir la cepa y sus factores de virulencia (glucosiltransferasas) para evitar su adhesión a la superficie dentaria y la adhesión de las próximas bacterias.^{34, 35,36}

- **Mecanismo de acción antibacteriana**

Actualmente no se tiene bien esclarecido su mecanismo de acción, pero se especula que este genera una especie de sinergismo entre todos sus componentes principalmente los que se hallan en las resinas.^{37, 38}

Usos Terapéuticos

Desde la antigüedad el propóleo fue utilizado en diferentes partes del mundo para combatir distintas enfermedades siendo utilizado como un fuerte antiviral, para la eliminar hongos como anti fúngico, para evitar la formación de óxidos como antioxidante, para la desinflamación de heridas o como antiinflamatorio, para prevenir la formación de tumores como antitumoral, para fortalecer el sistema inmune como inmunomodulador y para tratamiento de infecciones como antibacteriano.^{17, 18.}

Streptococcus mutans

Es una bacteria anaeróbica facultativa, gram positiva perteneciente a la flora microbiana de la cavidad oral; esta bacteria posee la capacidad de adherirse a un tejido duro con ayuda de su producción de polímeros de glucano que van formar junto a otras bacterias el biofilm cariológico que darán lugar a las lesiones cariosas por lo que al *S mutans* el principal agente causante de la caries dental. *S. mutans* está también

vinculada con enfermedades como endocarditis después de comprobarse su presencia en personas con dicha enfermedad. ³⁸⁻⁴³

Morfología:

S. mutans posee una forma de bacilo cuando es aislada de la cavidad oral, pero adopta una forma de coco cuando es cultivada y crece en cadena. Su morfología depende del pH al cual es sometido. ^{38, 39}

S. mutans no suele producir hemólisis, pero si serotipos como c, e, f y k, además posee la capacidad de fermentar glucosa, lactosa, manitol, etc. para convertirlo en ácido para producir la desmineralización del tejido dentario. ³⁹

Serotipos:

Puede ir variando en distintas personas o lugares del mundo, en Norteamérica y Europa el serotipo predominante es el serotipo c mientras que en el norte de África el más predominante es el serotipo b. Estos serotipos son los que determinarán las características y diversas formaciones de caries. ^{44,45}

Los serotipos considerados cariogénicos suelen estar entre los serotipos c, e, y f con mayor frecuencia y en menor frecuencia los *S. cricetus* (serotipo a), *S. rattus* (b), *S. sobrinus* (d y g), *S. macacae* (h), *S. downei* (h) ⁴⁴

Factores de virulencia:

El desarrollo y propagación de *S. mutans* se debe a los factores de virulencia que posee y van a permitirle causar daño al tejido dentario. Estos son la producción de bacteriocinas mutacinas que van a ayudar a inhibir a otros microorganismos permitiendo que el *S. mutans* se establecen dentro de otros nichos; producción de exopolisacáridos solubles e insolubles a partir de sus enzimas fructosiltransferasas

dándole la particularidad de adherirse a la superficie dentaria y permitir la adhesión de otros microorganismos. ^{40, 42, 45, 46}

Streptococcus oralis

Es una bacteria gram positiva comensal perteneciente al grupo Mitis perteneciente a la cavidad oral humana con una capacidad de patogenicidad oportunista debido a su considerable variación fenotípica y genética tras un cambio en su ambiente. Está asociada directamente a complicaciones tales como cáncer hematológico, endocarditis bacteriana, síndrome de dificultad respiratoria del adulto y el choque-- estreptocócica. ^{47.}

Por otro lado, se está viendo su posible uso como un probiótico debido a su capacidad de crecer en áreas adversas; se busca modificar S oralis con la única finalidad de ayudar en la restauración de la cavidad oral a través de la colonización en otros sitios alrededor de los dientes para mantenerlas libres de bacterias que degeneran la salud oral y competir con ellas. ⁴⁷

Morfología:

Es un α -hemolítico en forma de cocos que forman cadenas al momento de ser cultivadas; as condiciones óptimas para la supervivencia de S. órales son temperaturas entre 30 y 35 grados centígrados. ⁴⁸

Factores de virulencia:

Los factores de virulencia de S. oralis le permiten interactuar con otras bacterias no solo del biofilm cariogénico sino también del biofilm periodontal como

Porphyromonas gingivalis y les da una amplia capacidad metabólica los que le permite crecer en ambientes más adversos y utilizar una mayor variedad de nutrientes.^{47,48}

III Hipótesis

Si existe diferencia entre la marcha fitoquímica de tres propóleos y su actividad antibacteriana frente a cepas *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus oralis* (ATCC 35037).

IV. Metodología

4.1. Diseño de la investigación

Experimental: Se manipula la variable independiente para manifestar un efecto en la variable dependiente y obtener un resultado.^{49.}

Prospectivo: información que se va registrando cuando va sucediendo los hechos programados para observar.^{49.}

Transversal: se mide la prevalencia de la exposición y del efecto en una población en un solo momento.^{49.}

Analítico: se explica la causa de determinado fenómeno, trata la relación entre variables.⁴⁹

4.2. Población y muestra

Población: La población fue constituida por cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus oralis* (ATCC 35037).

Muestra: La muestra es no probabilística, fue tomada por conveniencia y fueron 2 repeticiones por grupo.

4.3. Definición y operacionalización de variable

VARIABLES	DIMENSIONES	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADORES	VALORES Y CATEGORIAS	TIPO	ESCALA DE MEDICIÓN
Efecto Antibacteriano	No Aplica	Capacidad de una sustancia de inhibir el crecimiento o desarrollo de bacterias	Capacidad del extracto del propóleo de inhibir el crecimiento o desarrollo de bacterias <i>S. mutans</i> y <i>S. orlis</i>	Halo de Inhibición	mm	Cuantitativo	De razón
Marcha Fitoquímica	<ul style="list-style-type: none"> • Taninos • Aminoácidos • Flavonoides • Esteroides • Quinonas • Cardenólidos • Alcaloides 	Determinación de la composición química y estructural del núcleo de un metabolito secundario vegetal	Metabolitos secundarios vegetales obtenidas a partir del extracto etanólico de los propóleos	Intensidad de la Presencia de los Componentes	Ausencia (-) Poca (+) Moderada (++) Alta (+++)	Cualitativo	Ordinal

Cuantificación de Polifenoles	No Aplica	Determinación de la cantidad de polifenoles totales en el extracto.	Determinación de la cantidad de polifenoles totales en el extracto etanólico de los propóleos	Concentración	Mg/g	Cuantitativo	De razón
Procedencia del Propóleo	No Aplica	Ubicación donde se encuentra la apícola de donde se extrae el propóleos	Lugar donde se encuentra la granja apícola de donde se extrae los propóleos	Lugar de obtención de propóleo	Arequipa , Huánuco y Huaraz ,	Cualitativa	Nominal

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

4.4.1. Técnica: se utilizó la técnica de observación microbiológica

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

Para la ejecución el personal capacitado firmó una constancia de asesoramiento al investigador (Ver Anexo 02 ,03)

Para evidenciar ejecución del proyecto se tomaron fotografías (Ver anexo 05)

4.4.3. Protocolos experimentales

4.4.3.1. Obtención del Propóleo

Al considerar que las abejas *Apis mellifera*, son más productivas cuando los apiarios se ubican a más de 1000 m de altitud, el propóleo será obtenido directamente de los apicultores de las siguientes zonas de Huaraz, Huánuco y Arequipa.

Las muestras se recogieron con espátula de plástico y llevados a recipientes herméticos de vidrio, fueron cubiertos con bolsas oscuras y selladas para luego ser llevadas al laboratorio de la facultad de Ciencias de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote.

4.4.3.2. Obtención del extracto etanólicos de propóleo

Se realizó el protocolo de Tolosa⁵⁰ con modificaciones:

El extracto se realizó con 10gr de propóleo en 100ml de etanol de 96°. Donde se obtuvo una muestra homogénea. Se desinfectaron, rotularon de la A-C y forraron los frascos con papel aluminio. Se pesaron (balanza analítica) 10 gr de cada propóleo, utilizando una espátula de plástico para transportar el material a la balanza posteriormente agregaron 100 ml de etanol a cada frasco, se taparon, agitaron y cubrieron con papel aluminio los 6 frascos para asegurar el ingreso de luz. 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 24 horas temperatura ambiente.

Filtración al vacío en caliente:

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

Se encendió la bomba de membrana al vacío hasta la obtención de los extractos etanólicos de propóleo y se almacenaron las muestras a 4°C hasta su uso en la obtención de las disoluciones.

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

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

4.4.3.4. Método para la caracterización Fitoquímica del propóleo

Para la obtención de la marcha fitoquímica se siguió el protocolo brindado por Hinojosa et al.⁵¹ con algunas modificaciones

Se lavaron, desinfectaron, forraron con papel aluminio y rotularon., 6 balones para cada muestra. Se procedió a pesar la muestra seca de cada propóleo 10 g en la balanza analítica con

ayuda de espátula de plástico y llevado a cada balón. Se agregó a cada balón 100 ml de etanol.

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

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

Se colocaron las muestras sobre la estufa eléctrica, a calentamiento a una temperatura entre los 60 a 80° por 4 horas. Pasado las 4 horas de reflujo se procedió a la eliminación del solvente a través del rotovapor.

Separación de 4 ml fracción “A”

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

Reactivos

Reactivo Gelatina: Taninos

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

a cada muestra. Se observó la reacción para luego interpretar cada una.

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

Reactivo Cloruro férrico: Fenoles

La prueba del cloruro férrico es utilizada para determinar la presencia o ausencia de fenoles en una muestra dada.⁵¹

En las placas excavadas de laboratorio y se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción “A” en cada pocillo.
- 1 gota del reactivo de cloruro férrico al 0.1 % a cada pocillo.
- Se observó la reacción para luego interpretar cada una.
- Para esta prueba se considera positiva la aparición de un precipitado, donde puede formarse un complejo coloreado transitorio o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) que permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos, determina tanto fenoles como taninos.

Reactivo Ninhidrina: para aminoácidos

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

correspondiente aldehído, así como la forma reducida de la Ninhidrina.

En las placas excavadas de laboratorio, se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción “A”.
- 3 gotas del reactivo ninhidrina a cada muestra.
- Se observó la reacción para luego interpretar cada una.
- La aparición de un color violáceo o amarillo y precipitado determina como positiva a una prueba.

Reactivo shinoda: flavonoides

En las placas excavadas de laboratorio se agregaron:

- 1ml de cada muestra de la fracción “A”.
- Limaduras de magnesio a cada muestra de la A-C.
- Se agregaron 2 gotas de HCL.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
- El desarrollo inmediato de la coloración es indicativo de la presencia de: flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanonoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

Secado con rotavapor

Se utilizó para separar por medio de evaporación a presión reducida y suave, el solvente metanol del soluto propóleo.

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

Se calibró el Baño María a 60°C y el sistema de rotación del matraz de evaporación empezó a girar. Se redujo la presión atmosférica mediante la aplicación de una bomba de vacío permitiendo que los solventes sean separados del soluto y destilados en el tubo de condensación a baja temperatura (agua helada) y recolectados en el balón colector.

Extraer con ácido clorhídrico

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

Filtración

En la muestra B se utilizó la filtración por gravedad, esta que se realiza a través de un embudo de vidrio provisto de un filtro de papel, cónico donde el líquido pasa a través de ellos por efecto de la gravedad, quedando la parte sólida retenida en el filtro.

Las demás muestras pasaron por filtración al vacío que es más rápida que la filtración por gravedad.

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

Fase insoluble- fracción B

El precipitado, sustancia sólida visible que se consiguió con el método de filtración (parte que permaneció en el papel filtro y que luego se puso en el balón).⁵¹

- El objetivo de lavar el precipitado es eliminar moléculas del líquido filtrado puesto que algo de este puede haberse quedado adherido al precipitado.
- Los precipitados se deben lavar con sustancias que no los disuelvan, en este caso lavamos con agua destilada en pequeños volúmenes, se agitó levemente y se llevó a filtración por gravedad; esta operación se realizó tres veces.
- Después de lavar la parte insoluble se agregaron 10 ml de triclorometano.
- Se calentó en baño maría, se llevó a filtración por gravedad y fue secado con sulfato de sodio; éste que fue agregado en el papel filtro. La parte filtrada de cada muestra se guardó en frascos ámbar (6 frascos) lavados desinfectados y rotulados previamente. Así se obtuvo la FRACCION B.

Reactivos

Reactivo de Lieberman Burchard: para esteroides

Anhídrido acético + Ácido sulfúrico:

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

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

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

Reactivo Borntrager: para quinonas

NaOH al 10% diluido en agua destilada.

- En tubos de ensayo se agregaron:
- 1ml de cada muestra de la fracción “B” en cada tubo.
- 2 gotas de NaOH al 10% (hidróxido de sodio)
- El cambio de coloración nos indicó la presencia de compuestos quinónicos al utilizar el NaOH al 10 %. Indica positivo cuando hay presencia de una fase acuosa roja o amarilla con fluorescencia roja.
- Se observó la formación de una coloración rosada a roja, indicándonos la presencia de antraquinonas.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Solución ácida

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

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

Extracción: es un proceso de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventes no miscibles entre sí, con diferente grado de solubilidad y que están en unión a través de una interface.⁵¹

En el laboratorio el proceso se desarrolló de la siguiente manera:

- Embudo de decantación con la sustancia (solución ácida) a temperatura ambiente con pH alcalino con disolvente 1.
- Se agregó el disolvente 2 triclorometano en 25ml en el que se extraerá y en el que la solubilidad de la sustancia es mayor.
- Se tapó el embudo y se agitó vigorosamente para formar una emulsión de los dos líquidos inmiscibles y permitir el reparto de la sustancia entre ambos.

- Se abrió la válvula del embudo después de agitar para que los gases que se puedan haber formado puedan salir del embudo.
- Se dejó decantar por 14 horas para que se forme una interface clara entre ambos. Fase superior (Fase acuosa), fase inferior (fase clorofórmica).

Fase clorofórmica: fracción C

- Pasado las 14 horas se abrió la espita inferior del embudo y se dejó caer el líquido más denso (fase clorofórmica) en un embudo de decantación.
- Fase clorofórmica: en la filtración con solo papel filtro pueden pasar moléculas de la fase acuosa en el cloroformo y alterar los resultados, por esta razón para asegurarnos de que no ingrese ninguna molécula, se hace el lavado que consiste en agregar 10ml de agua destilada, agitar con el fin de que ésta arrastre las moléculas que puedan encontrarse, unirse y llevarlas a la fase acuosa, formándose así nuevamente dos fases.
- Se dejó decantar por 30 minutos.

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

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

Reactivos

Reactivo Balget: para cardenolidos

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

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

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

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

- 2 o 3 gotas de muestra de cada tubo.
- 3 a 4 gotas de la solución de ácido pícrico al 1%.
- 3 a 4 gotas de NaOH al 10%.

- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.

El cambio de coloración nos indicó la presencia de cardenolidos.

Se observó la formación de una coloración amarillo a rojo oscuro, indicándonos la presencia cardenolidos.

- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Reactivo de Lieberman Burchard

Anhídrido acético +Ácido sulfúrico+Triclorometano

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

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

Si hay formación de colores azul, verde que cambian con el tiempo indica presencia del núcleo esteroide.

- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Reactivo drangendorff: para alcaloides

- Se trabajó en tubos de ensayo previamente lavados y rotulados a de la A-F.
- Se añadieron 2ml de cada muestra de la fracción "C".
- Se secaron las muestras por evaporación en baño maría.
- Después de secar las muestras se agregaron 2 ml de HCL al 1% a cada tubo.
- En placas escavadas de laboratorio se filtraron 3 gotas de cada muestra en cada pocillo de la placa.
- Se agregaron de 3 a 4 gotas del reactivo Drangendorff a cada muestra.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
- Da positivo si se forma un precipitado pardo anaranjado.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Fase acuosa

- La saturación es el punto en que una solución de una sustancia no puede disolver más de dicha sustancia, y que cantidades adicionales aparecerán como un precipitado. Este punto de máxima concentración es el punto de saturación.
- A la fase acuosa que quedó retenida en el primer embudo de decantación se saturó con una solución de sulfato de sodio y sal anhidra.

- EXTRAER: se hizo una mezcla con triclorometano más etanol y se agregó a la fase acuosa, se agitó y se dejó decantar. Como resultado se obtuvieron dos fases: fase cloroformico-etanolica (fase inferior) y la fase acuosa remanente.

Fase cloroformica-etanólica: fracción “D”

- Se abrió la espita inferior del embudo y se dejó escurrir el líquido más denso fase clorofórmica-etanólico en un embudo de decantación. La fase acuosa se deja en el embudo de origen.
- A la fase clorofórmica-etanólica se agregó 10ml de solución de sulfato sódico para el lavado, en el que se agitó con el fin de que éste arrastrara las moléculas que se encontraran, unir las y llevarlas a la fase acuosa, formándose así nuevamente dos fases.
- Se dejó decantar hasta que se formen bien las dos fases.
- SECADO Y FILTRACION: Se abrió la espita inferior del embudo de decantación que estaba sostenido por una pinza por encima del embudo con papel filtro con sulfato de sodio (para retener moléculas de la fase acuosa), éste que estaba dentro del frasco ámbar (lavado, desinfectado y rotulado previamente) y se dejó filtrar el líquido más denso fase clorofórmica-etanólica en el frasco ámbar. Así obtuvimos la fracción “D”. Este procedimiento se realizó a las 3 muestras.

Reactivos para fracción “D”

- En 3 tubos de ensayo se agregaron 1ml de cada muestra + 2.5 ml de etanol.
- Se llevaron a baño maría a evaporación a sequedad.
- Después de haberse secado por completo se agregaron a todos los tubos 2.5 ml de etanol.
- Este procedimiento se aplicó para cada reactivo de esta fracción.

Reactivo shinoda: para flavonoides

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

Reactivo de rosenheim: para leucantocianidinas

- A los 6 tubos de ensayo con 1ml de muestra de la fracción D, previamente secados a vapor en baño maría y agregados 2.5ml de etanol.
- Se agregaron 3 a 4 gotas del reactivo Rosenheim.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada muestra.
- El desarrollo inmediato de la coloración rosado o rojo carmesí es indicativo de la presencia de leucantocianidinas.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Reactivo balget: para cardenolidos

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

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

- Se observó la formación de una coloración amarillo a rojo oscuro, indicándonos la presencia cardenolidos.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Reactivo de Lieberman Burchard

Anhídrido acético + Ácido sulfúrico

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

Se agregaron cada tubo de ensayo:

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

Reactivo Drangendorff: para alcaloides

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

Se añadieron a cada tubo de ensayo:

- 2 ml de HCL al 1%
- 1ml de triclorometano.
- 3 o 4 gotas de HCL al 1%.
- 3 a 4 gotas del reactivo Drangendorff.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada una.
- Da positivo si se forma un precipitado pardo anaranjado.
- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Fracción “E”

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

Reactivo Rosenheim: Leucantocianidinas

En las placas excavadoras de laboratorio, se agregaron:

- 1ml aprox. de cada muestra de la fracción “E”.
- 3 a 4 gotas del reactivo Rosenheim.
- Se observó la reacción para luego interpretar a cada muestra.
- El desarrollo inmediato de la coloración rojo carmesí es indicativo de la presencia de leucantocianidinas.

- Cada reacción se interpretó con los valores establecidos en el proyecto Ausencia (-), Poca (+), Moderada (++) y Alta (+++).

Reactivo sinodal: para flavonoides

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

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

4.4.3.5. De la determinación de polifenoles totales

Se realizó según el método de Folin Ciocalteu.⁵² con algunas modificaciones: Mediante el empleo de un espectrofotómetro UV- Vis, En un tubo de reacción se adicionarán 50 µl de solución etanólica de propóleo, 2.5ml de agua y 500 µl de reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck). Se agito y luego se dejó en reposo por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 2ml de Na₂CO₃ al 10%. Después de 90 minutos en

la oscuridad se leerá la absorbancia a 700 nm. Usando la curva de calibración el estándar de catequina el cual permitirá obtener la concentración de polifenoles totales expresado en miligramos de polifenoles totales por gramos de propóleo. Este procedimiento se efectuó con cada uno de los propóleos objeto de estudio por triplicado.

Se eligieron las soluciones etanólica de propóleo de cada muestra según su concentración máxima, intermedio o mínima.

4.4.3.6. De la obtención de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*.

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

Streptococcus mutans:

1. Se abre el Vial ATCC según instrucciones, se reconstituye la cepa liofilizada con 3 ml de BHI.
2. Se realiza el sembrado en cuatro tubos conteniendo c/u seis mililitros de BHI a cuáles se les colocó 0.5 ml aproximadamente de medio BHI conteniendo la cepa y se coloca en la estufa a 37° C en condiciones microaeróbicas sellándose la parte superior con parafilm por 24 horas.
3. Y por último se siembra en 1 tubo conteniendo 6 ml de thioglicolato al cual se colocó 0.5 ml aproximadamente

de medio BHI conteniendo la cepa y se coloca en la estufa a 37° C en condiciones microaeróbicas por 24 horas.

Streptococcus oralis

1. Se abre el Vial ATCC según instrucciones, se reconstituye la cepa liofilizada con 3 ml de BHI.
2. Se realiza el sembrado en 6 tubos conteniendo c/u 6mm de BHI a cuáles se les colocó 0.5 ml de medio BHI conteniendo la cepa y se coloca en la estufa a 37° C en condiciones aeróbicas sellándose la parte superior con parafilm por 24 horas.
3. También se realiza la siembra en 2 placas de agar sangre con BHA a los cuales se le agrega también 0.5 ml de la cepa sacada directamente del vial se realiza la dispersión a través del medio con el asa de siembra y se coloca en la estufa a 37° C en condiciones microaeróbicas por 24 horas.
4. Y por último se siembra en 1 tubo conteniendo 6 ml de thioglicolato al cual se colocó 0.5 ml de medio BHI conteniendo la cepa y se coloca en la estufa a 37° C en condiciones aeróbicas por 24 horas.

4.4.5. Del enfrentamiento microbiano.

Streptococcus oralis

1. Previamente se incubó la cepa de *S. oralis* ATCC 35037 a 37°C x 24 horas en 2 tubos de BHI conteniendo 6 mililitros cada uno.
2. Se preparó 3 frascos de BHA con 250 ml c/u para el enfrentamiento, un día anterior el cual se diluyó a baño maría.
3. Los 2 tubos que se sembraron anteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 8 minutos, posteriormente se decantó y se reconstituyó el pellet con caldo BHI hasta obtener una densidad óptica de 0.260.
4. Luego se pasó 4ml de esta dilución a un tubo conteniendo 40ml de BHI, se homogenizó y se colocó a partir de este prepara 1ml en veinticinco lacas a las cuales posteriormente se le adicionó 25ml de BHA licuado, se homogenizó.
5. Se dejó solidificar el agar y se pasó a realizar los pozos con un sacabocado de 6 mm, y en dichos pozos se agregó 100 µl de cada propóleo, la prueba se hizo por duplicado. Se consideró también etanol de 96° como control negativo y como control positivo clorhexidina de 0.12%.
6. Se dejó a incubar por 24 horas a 37°C en microanaerofilia.
7. Pasada las 24 horas hicieron las mediciones de halos de inhibición con la regla de precisión milimetrada Vogel con DIN/ISO 866/I

Streptococcus mutans

1. Previamente se incubó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a 37°C x 24 horas en dos tubos de BHI conteniendo seis mililitros cada uno.
2. Se preparó tres frascos de BHA con 250ml c/u para el enfrentamiento, un día anterior el cual se diluyó a baño maría
3. Los 2 tubos que se sembraron anteriormente se centrifugaron a 2500 rpm durante 8 minutos, posteriormente se decantó y se reconstituyó el pellet con caldo BHI hasta obtener una densidad óptica de 0.270.
4. Luego se pasó 4ml de esta dilución a un tubo conteniendo 40 ml de BHI, se homogenizó y se colocó a partir de este prepara 1 ml en 25 placas a las cuales posteriormente se le adicionó 25 ml de BHA licuado, se homogenizó.
5. Se dejó solidificar el agar y se pasó a realizar los pozos con un sacabocado de 6 mm, y en dichos pozos se agregó 100 µl de cada propóleo, la prueba se hizo por duplicado. Se consideró también etanol de 96° como control negativo y como control positivo clorhexidina de 0.12%.
6. . Se dejó a incubar por 24 horas a 37°C en microanaerofilia
7. Pasada las 24 horas hicieron las mediciones de halos de inhibición con la regla de precisión milimetrada Vogel con DIN/ISO 866/I.

4.5. Plan de Análisis

Los datos recolectados fueron procesados por IBM SPSS Statistics 24 y presentados en tablas con medias y desviaciones estándar del efecto antibacteriano y sensibilidad de los tres propóleos peruanos en sus distintas concentraciones experimentadas

El efecto antibacteriano de cada propóleo fue comparado en sus distintas concentraciones empleando ANOVA y el test de Tukey. En cambio, dada la presencia de controles, la sensibilidad de las concentraciones de cada propóleo fue comparada con cada uno de los controles empleando el ANOVA y la prueba Dunnett. Finalmente, se comparó las distintas concentraciones y propóleos empleando ANOVA y pruebas de Tukey. Además, se estableció la correlación entre el efecto del propóleo y la cantidad de polifenoles en el mismo, empleando el test de T para coeficientes de correlación de Pearson.

La significancia fue considerada si $p < 0.05$

4.6. Matriz de consistencia

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	METODOLOGIA	POBLACION
¿Cuál es la diferencia entre la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su actividad antibacteriana sobre Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Streptococcus	<p>Objetivo general: Determinar la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su efecto antibacteriano frente a cepas de Streptococcus mutans (ATCC25175) y Streptococcus oralis(ATCC35037)</p> <p>Objetivo específico: Evaluar el efecto invitro de la actividad antibacteriana del extracto de tres propóleos peruanos sobre Streptococcus mutans (ATCC25175) y Streptococcus oralis(ATCC 35037)</p> <p>Correlacionar la concentración de polifenoles totales y actividad antibacteriana de tres propóleos peruanos</p>	Si existe diferencia entre la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos y su actividad antibacteriana frente a cepas <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC	<p>Tipo de investigación Es una investigación de tipo cuantitativo.</p> <p>Nivel de investigación Es una investigación de nivel explicativo.</p>	La población esta constituido por colonias de S. mutans ATCC 25175 Streptococcus oralis(ATCC35037) Muestra:

<p>oralis(ATCC 35037)?</p>	<p>Comparar in vitro la actividad antibacteriana entre las concentraciones de tres propóleos peruanos y etanol al 96 % sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Streptococcus oralis (ATCC 35037)</p> <p>Comparar in vitro la actividad antibacteriana entre las concentraciones de tres propóleos peruanos y clorhexidina 0.12 % sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Streptococcus oralis (ATCC 35037)</p>	<p>25175) y <i>Streptococcus oralis</i> (ATCC 35037)</p>	<p>Diseño de la investigación</p> <p>Experimental, prospectivo, longitudinal, analítico.</p>	<p>La muestra fue tomada por conveniencia y está constituida por dos repeticiones por grupo</p>
----------------------------	--	--	---	---

4.7. Principios éticos

Se sometió a los principios éticos consignados en el código de ética de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, además el material utilizado fue llevado a la autoclave antes del desecharlo, así evitaremos la contaminación del medio ambiente donde se realizó la ejecución.

V. Resultados

5.1 Resultados

Tabla 1

Caracterización fitoquímica de tres propóleos peruanos

Fracción	Metabolitos	Reactivos	Arequipa	Huánuco	Huaraz
A	Taninos	Gelatina	+++	+++	+++
	Taninos	Cloruro férrico	+++	++	+++
	Aminoácidos	R. Nihidrina	+++	+++	+++
	Flavonoides	R. Shinoda	+++	++	++
B	Esteroides	Lieberman-Burchard	+++	+++	+++
	Quinonas	R. Bomtranger	++	-	-
C	Cardenolitos	R. Balgelt	+	+	+
	Cardenolitos	R. Lieberman-Burchard	++	+++	++
	Alcaloides	R. Drangendorff	+++	++	++
D	Flavonoides	R. Shinoda	++	-	-
	Leuciantocianidinas	R. Rosenheim	-	-	-
	Cardenolitos	R. Balgelt	+	+	+
	Esteroides y triterenos	R. Lieberman-Burchard	+	-	-
	Alcaloides	R. Drangendorff	-	-	-
E	Leuciantocianidinas	R. Rosenheim	-	-	-
	Flavonoides	R. Shinoda	++	-	-

Ausencia (-) Poca (+) Moderada (++) Alta (+++)

Fuente: Datos proporcionados por el autor

En la fracción A, el propóleo de Arequipa tuvo alta presencia de los metabolitos; algo similar del propóleo de Huaraz el cual tuvo también alta presencia con la excepción presencia moderada de los flavonoides; y el propóleo de Huánuco tuvo moderada o alta presencia de los metabolitos. En la fracción B, todos los propóleos tuvieron alta presencia de esteroides y solamente el de Arequipa moderada presencia de quinonas. En la fracción C, los tres propóleos tuvieron poca presencia de cardenolitos y moderada o alta presencia de Núcleo de esteroides y alcaloides. En la fracción D, el propóleo de Arequipa tuvo moderada presencia de flavonoides. Y, en la fracción E, únicamente se encontró moderada presencia de flavonoides en el propóleo de Arequipa

Tabla 2

Actividad antibacteriana de tres propóleos peruanos sobre Streptococcus mutans y Streptococcus oralis

		AREQUIPA			HUÁNUCO			HUARAZ		
		10%	5%	2.5%	2%	1%	0.5%	5%	2.5%	1.25%
S. mutans (ATCC 25175)	Media	18.5	16.5	14.0	10.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0
	DE	0.71	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	ANOVA:									
	F	1083.375								
	P	0.000								
Duncan	e	d	c	b	a	a	b	a	a	a
S. oralis (ATCC 35037)	Media	19.0	16.5	15.0	12.0	11.5	11.5	12.0	11.0	10.5
	DE	1.41	0.71	0.00	0.00	0.71	0.71	0.00	1.41	0.71
	ANOVA:									
	F	25.708								
	P	0.000								
Duncan	c	b	b	a	a	a	a	a	a	a

Fuente: Datos proporcionados por el auto

En la actividad antibacteriana, los propóleos peruanos en sus distintas concentraciones evaluadas muestran a través del ANOVA efecto sobre S. mutans ($F=1083.375$, $p=0.000<0.05$), presentando según la prueba de Duncan mayor actividad el propóleo de Arequipa a una concentración del 10% (media=18.5 mm, DE=0.71 mm. Igualmente, los propóleos muestran actividad antimicrobiana sobre S. oralis ($F=25.708$, $p=0.000<0.05$), presentando también el propóleo de Arequipa con una concentración al 10% el mayor halo de inhibición (media=19.0 mm, DE=1.41 mm.(media=16.5 mm, DE=0.71 mm).

Fuente: Datos proporcionados por el autor

Tabla 3

Evaluación del efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos, etanol y clorhexidina, frente a cepas de Streptococcus mutans y Streptococcus oralis

	AREQUIPA			HUÁNUCO			HUARAZ			Etanol	Clorhexidina	
	10%	5%	2.5%	2%	1%	0.5%	5%	2.5%	1.25%			
Media	18.5	16.5	14.0	10.0	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	29.5	
DE	0.71	0.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.71	
Control: Etanol												
S. mutans (ATCC 25175)	ANOVA: F	560.667			Imposibilidad numérica			Imposibilidad numérica				
	P	0.000										
	Dunnett	b	b	b							a	
Control: Clorhexidina												
	ANOVA: F	249.222			3094.333			3094.333				
	P	0.000			0.000			0.000				
	Dunnett	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	
Media	19.0	16.5	15.0	12.0	11.5	11.5	12.0	11.0	10.5	0.0	19.5	
DE	1.41	0.71	0.00	0.00	0.71	0.71	0.00	1.41	0.71	0.00	0.71	
Control: Etanol												
S. oralis (ATCC 35037)	ANOVA: F	235.400			272.667			101.000				
	P	0.000			0.000			0.000				
	Dunnett	b	b	b	b	b	b	b	b	b	a	
Control: Clorhexidina												
	ANOVA: F	12.000			82.111			47.333				
	P	0.018			0.000			0.001				
	Dunnett	b	b	b	a	a	a	a	a	a	b	

Fuente: Datos proporcionados por el autor

Considerando como control el etanol, los tres propóleos peruanos en cualquiera de sus concentraciones muestran superioridad en su sensibilidad sobre *S. oralis*, verificados a través del ANOVA y las pruebas de Dunnett ($p < 0.05$ en todos los casos); y sobre *S. mutans* el propóleo de Arequipa en todas las concentraciones evaluadas, no siendo posible la evaluación estadística en el caso de los propóleos de Huánuco y Huaraz debido a la coincidencia del valor de la sensibilidad en los pozos examinados. Al considerar la clorhexidina como parte de los grupos a comparar, las pruebas ANOVA muestran evidencia de diferencias entre los tratamientos tanto con la cepa de *Streptococcus mutans* como con la cepa de *Streptococcus oralis* ($p < 0.05$, en cada caso). En el control de la cepa de *Streptococcus mutans*, ninguno de los propóleos, en las concentraciones evaluadas, alcanzó la sensibilidad de la clorhexidina. En cambio, en el control de *Streptococcus oralis*, el propóleo al 10% de Arequipa (19.0) mostró similar sensibilidad que la clorhexidina (19.5).

Tabla 4

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

Lugar	Concentración	Halo (mm)		Polifenoles (mg)
		S. mutans	S. Orealis	
Arequipa	10%	18.5	18.5	1.02
	5%	16.5	16.5	1.00
	2.5%	14.0	14.0	1.00
Huánuco	2%	10.0	12.0	0.48
	1%	0.0	11.5	0.42
	0.5%	0.0	11.5	0.39
Huaraz	5%	10.0	12.0	0.60
	2.5%	0.0	11.0	0.59
	1.25%	0.0	10.5	0.58
Correlación de Pearson		0.879	0.769	
t		4.877	3.183	
p		0.002	0.015	

La correlación entre polifenoles y efecto antibacteriano de los propóleos es positiva, tanto si trata de las cepas *S. mutans* ($R=0.879$, $p=0.002<0.05$) como de las cepas *S. oralis* ($R=0.769$, $p=0.015<0.05$), lo cual significa que a mayor concentración de polifenoles en los propóleos mayores es el halo de inhibición o lo que es lo mismo mayor actividad antibacteriana.

5.2 Análisis de Resultados

Los resultados de este estudio mostraron que el extracto con mayor efecto antibacteriano sobre *S mutans* es el recolectado en Arequipa al 10% con un halo de 18.5 mm seguido por el de 5% con un halo de 16.5 mm, al 2.5% con un halo de 14 mm, quien continuó fue el extracto de Huánuco al 2% con un halo de 10 mm al igual que el extracto de Huaraz al 5%; estos resultados muestran que la concentración influye en el efecto antibacteriano debido a que el extracto de Arequipa poseía las mayores concentraciones a diferencia de Huánuco y Huaraz esto confirma los resultados de Huayhua et al. ² quien al comparar los extractos de propóleos al 5% y 10% fue al 10% donde obtuvo un mejor resultado con un halo de 24 mm mientras que el extracto de propóleo al 5% obtuvo un halo de 20mm asimismo Ramírez et. al.¹ obtuvo el mejor resultado con su extracto al 100% con un halo de 14.25 mm mientras que al 75% encontró 11.7 mm de halo, al 50% 10.5 mm, y en último lugar al 25% con un halo de 7.5 mm.

Sin embargo, no solo la concentración puede influir en el efecto antibacteriano sino el lugar de origen también ya que analizar los resultados del extracto de Arequipa al 5% este mostro un halo de 16.5 mm mientras que el extracto de Huaraz también al 5% mostró un halo de tan solo 10 mm asimismo Eguizábal et. al. ³ quienes estudiaron el extracto de Oxapampa en concentraciones de 0.8%, 20% y 30% obtuvo resultados opuestos a lo de los autores anteriores ya que en sus resultados de observó que a menor concentración existía un mayor efecto ya que 0.8% logró un halo de 13,56 mm, al 20% un halo de 12mm

y el de 30% un halo de 12.3 mm confirmando que el efecto no depende solo de la concentración, sino que el lugar de origen va a influir en la actividad antibacteriana del propóleo.

De igual manera los extractos de propóleos pueden causar un efecto distinto según el tipo de bacteria ya que frente a *S. oralis* todos los extractos en las distintas concentraciones mostraron un halo de inhibición mientras que en *S. mutans* algunas concentraciones no mostraron efecto alguno esto es respaldado por el estudio de El-Tabakh⁵ quien evaluó los extractos de propóleos en distintas bacterias teniendo halos de inhibición distintos para diferentes bacterias siendo 22 mm para *S. orales* 26mm para *Staphylococcus albus*, 23mm para *Staphylococcus aureus* entre otras.

En la evaluación de los metabolitos se confirmó la presencia de taninos, aminoácidos, cardelolitos y esteroides en la misma intensidad para los tres extractos; se observó la presencia de flavonoides, quinonas y alcaloides en los tres extractos pero con mayor intensidad para el de Arequipa demostró; la presencia de quinonas fue solo en los extractos de Arequipa demostrando así que la cantidad de metabolitos y la presencia de los mismos van a depender del lugar de origen como lo mostró Soto⁴ en su estudio para determinar los metabolitos de extractos etanólicos de propóleos de distintos lugares: Piura, Ayacucho y Pucallpa donde la presencia de Antocianidina, triterpenos y esteroides, catequinas, lactonas, se encontraba con la misma intensidad en los tres extractos, asimismo la presencia de fenoles, taninos y

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

En la evaluación de la correlación de polifenoles y efecto antibacteriano se afirma que a mayor concentración de polifenoles en el propóleo mayor será el efecto antibacteriano, esto se debe a que los polifenoles son fuente principal de acción antibacteriana como la catequina que ha mostrado de forma individual su acción antibacteriana frente a cepas de E coli.

VI. Conclusiones

- Los extractos de propóleo de Arequipa mostraron efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *S. mutans* en todas sus concentraciones, mientras que los extractos de Huánuco y Huaraz mostraron efecto antibacteriano solo en su concentración más alta.
- Los extractos de propóleo de Arequipa, Huánuco y Huaraz mostraron efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *S. oralis* en todas sus concentraciones.
- El extracto de Arequipa en sus concentraciones al 10%, 5% y 2.5% respectivamente mostró mejor efecto antibacteriano, seguido por el de Huánuco al 2% y Huaraz al 5% frente a *S. mutans*.
- El extracto de Arequipa en sus concentraciones al 10%, 5% y 2.5% respectivamente mostró mejor efecto antibacteriano, seguido por el de Huánuco al 2% y Huaraz al 5%, y con menos efecto las concentraciones de Huánuco al 1% y 0.5% y Huaraz al 2.5% y 1.25% frente a *S. oralis*.
- Los resultados del efecto antimicrobiano de los extractos de propóleos frente a *S. mutans* y *S. oralis* coincide con la marcha fotoquímica y con el conteo de polifenoles.

Aspectos complementarios:

Si bien los resultados obtenidos en este estudio son positivos se recomienda realizar más estudios que comparen la ubicación geográfica de los propóleos con concentraciones del mismo valor y así poder observar si influye o no la ubicación en el efecto antibacteriano y conteo de polifenoles.

Referencias bibliográficas

1. Barrientos L, Herrera C, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, Cuevas A, Saavedra N, Salazar L. Caracterización química y botánica de propóleo chilenas y la actividad biológica de las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus*
2. Pérez A. Biopelícula: una nueva visión de la placa dental. Rev. Estomatol Herediana.(Internet) 2005 (citado el 25 de febrero2017) 15(1): 82 – 85.
Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421539343016>
3. Dziejczak A, Kubina R, Wojtyczka R, Dzik A, Tanasiewicz M, Morawiec T. El efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleos polacas sobre estreptococos *mutans* y *Lactobacillus* aislado de la saliva. Evid Based Complemento Alternat Med. 2013; 20(13): 681-891.
4. Dorkhan M, Chavez L, Skepö M, Svensäter G, Davies J. Effects of saliva or serum coating on adherence of *Streptococcus oralis* strains to titanium. Microbiology. (Internet) 2012.(citado el 25 de febrero 2017) 15(8): 390-397.
Disponible en:_
https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/158/2/390_mic054536.pdf?expires=1548697926&id=id&accname=guest&checksum=97D1FDD83A4EA543E3CC5EB6652FB762

5. Dorkhan M, Svensäter G, Davies J. Unas películas salivales en titanio y su efecto sobre la actividad metabólica en orales. *BMC Oral Health*. 2013; 13: 32.
6. Akca A, Akca G, Topcu F, Macit E, Pıkdöken L, Özgen S. La evaluación comparativa de la acción antimicrobiana de propóleos con clorhexidina frente a patógenos orales: un estudio in vitro. *Biomed Res Int*. 2016; 20(16): 3.627.463. *sobrinus. Braz J Microbiol*. 2013; 44 (2): 577-585.
7. 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 clínica odontológica, una puno – 2016. Tesis para optar el título de cirujano dentista. Universidad Nacional del Altiplano. Puno 2016
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 *streptococcuss mitis*). *Ciencia y Desarrollo*. 2009; 10(1)
9. 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
10. 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.

11. El-Tabakh. Effect of proPolis and bee venom on bacterial culiure isolated from patients with conjunctivitis. (Tesis para optar el título de Microbiología). Banha. Benha University. 2010.
12. Samara-Ortega N, Benítez-Campo N, Cabezas-Fajardo F. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. Vol. 9 No. 1 (8 - 16) 2011_ <http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/view/177>
13. Mayta-Tovalino F, Sacsquispe-Contreras SJ. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Rev Estomatol Herediana*. 2010; 20(1):19-24.
14. Zhibing Wang, Rui Sun, Yuanpeng Wang, Na Li, Lei Li, Xiao Yang et. al. Determination of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by silica-supported ionic liquid-based matrix solid phase dispersion extraction high performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Chromatography B*. 2014; 969, 15: 205–212
15. Toret V, Sato H, Pastore G, Yong Kun Park. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013; 2013
16. 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.
17. 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.
 18. Vijay D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Adv Pharmacol Sci*. 2013; 2013
 19. 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. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011 Jan 27;133(2):253-60
 20. Fründ J, Zieger S, Tschardt T. Response diversity of wild bees to overwintering temperatures. *Oecologia*. 2013 Dec;173(4):1639-48.
 21. 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)
 22. Hallstam 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.

23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. Popova M, Chinou I, Marekov I, Bankova V. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry.* 2009; 70(10):1262-71.
27. 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.
28. Rengifo R. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. *Revista Farmaciencia.*(Internet) 2013(citado el 27 de febrero de 2017); 1(2). Disponible en :
<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/farmabioq/article/view/462/418>
29. 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

30. 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.
31. Arencibia D, Rosario L, Curveco D..Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Rev de Toxicologia en línea. 2009: 41-53
32. 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.
33. 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.(internet) 2009(citado en febrero 2017); 125(1):1-9.
Disponibile en:_
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874109002815?via%3Dihub>
34. Hamada, S., Slade H. Biology, immunology, and cariogenicity of S. mutans. Microbiological Reviews. 1980; 44, 331–384.
35. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats.Caries Res. 1991; 25(5):347-51.
36. Park Y, Ikegaki M, Alencar S. Classification of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. Mensagem Doce, 2000 58, 2-7.

37. 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.
38. Porte L, Braun S, Dabanch J, Egaña A, Andrighetti D. *Streptococcus mutans*: Una bacteria que hace honor a su nombre. *Rev. chil. infectol.* (Internet). 2009 (citado el 25 de febrero del 2017); 26(6): 571-571
39. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES odontol.* (Internet). 2013 (ciado el 25 de febrero del 2017); 26(1): 44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en.
40. Gamboa F. Identificación y caracterización, microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Rev. Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal.*(Internet) 2014 (citado el 25 de febrero 2017); 33(71): 65-73. Disponible en: <https://www.redalyc.org/html/2312/231242326009/>
41. Yang Y, Park BI, Hwang EH, You YO. Composition Analysis and Inhibitory Effect of *Sterculia lychnophora* against Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016;2016:8163150.
42. Kim D, Hwang G, Liu Y, Wang Y, Singh AP, Vorsa N, Koo H. Cranberry Flavonoids Modulate Cariogenic Properties of Mixed-Species Biofilm through Exopolysaccharides-Matrix Disruption. *PLoS One.* 2015 Dec 29;10(12)

43. Loesche W. Role of *S. mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*. 1986 50, 353–380.
44. Chávez E. Adherencia del *S. mutans* después del uso de la IgY extraído de la yema de huevo de gallinas hiperinmunizadas. [Tesis para optar al título de cirujano dentista]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima; 2009
45. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Vacca-Smith AM, Bowen WH. Inhibition of *S. mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(5):782-9.
46. Thuy D, Jolley k, Maiden M, Gilbert S, Clark D, Wade W, Beighton D. Population structure of *Streptococcus oralis*. *Microbiology*. 2009; 155 (8): 2593–2602.
47. Gisch N, Schwudke D, Thomsen S, Heß H, Hakenbeck R, Denapaitte D. Lipoteichoic acid of *Streptococcus oralis* Uo5: a novel biochemical structure comprising an unusual phosphorylcholine substitution pattern compared to *Streptococcus pneumoniae*. *Scientific Reports*. 2015; 16718 (5): 1-13
48. Hernandez Sampieri R Fernandez Collado, Baptista Lucio. M. Metodología de la Investigación. 5ª Ed. McGraw-Hill. Mexico, D.F, 2010. Pag 763.
Disponible en:
https://www.esup.edu.pe/descargas/dep_investigacion/Metodologia%20de%20la%20investigación%205ta%20Edición.pdf

49. 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.
50. Hinojosa J, Gutiérrez M, Siller F, Rodríguez A, Morales J, Guerrero P, et al. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. *Biotecnia*. 2013; 15(2): 53-60
51. Lady R, Carlos M, Jesús H, Benjamín A, Diego L. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae Rev. De la Facultad de Química Farmacéutica*. [Internet].2009 [citado 14 de febrero 2017]; Volumen 16: pags388-395.Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v16n3/v16n3a13.pdf>

ANEXOS

Anexos:

Anexo 1

Caracterización Fitoquímica del Propóleo.

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




**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo **JORGUE LUIS DEL ROSARIO CHAVARRI** Investigador asociado al laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo.

Dejo constancia de estar asesorando al alumno **INGRID VANNESA VARGAS PAJARES**, en la parte microbiológica, en el laboratorio de biotecnología e ingeniería genética de la Universidad Nacional de Trujillo con la tesis "Caracterización fitoquímica de tres propóleos peruanos y su actividad antibacteriana sobre cepas *Streptococcus mutans* (ATCC25175) y *Streptococcus oralis* (ATCC35037)"



JORGUE LUIS DEL ROSARIO CHAVARRI

Investigador asociado al laboratorio de Biotecnología e Ingeniería Genética

Anexo 3



UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE

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

Dejo constancia de haber colaborado en la realización de La Marcha Fitoquímica y el Contenido de Polifenoles Totales en muestras de propóleos con el estudiante **INGRID VANNESA VARGAS PAJARES**, que ha ejecutado su trabajo de investigación que lleva por Título: **“ESTUDIO COMPARATIVO INVITRO DE LA ACTIVIDAD DEL EXTRACTO HIDROETANOLICO DE TRES PROPOLEOS PERUANOS SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS-ATCC 25175 Y STREPTOCOCCUS ORALIS ATCC 35037”**


Mg. Q.F. Edison Vasquez Corales
JEFE LAB. QUIMICA

Anexo 4:

Tabla descriptiva con todos los valores

	Concentración	POZO 01		POZO 02	
		Sensibilidad		Sensibilidad	
		Streptococcus	Streptococcus	Streptococcus	Streptococcus
		mutans	oralis ATCC	mutans	oralis ATCC
		ATCC 25175	9811	ATCC 25175	9811
Arequipa	10	18	18	19	19
Arequipa	5	16	16	17	17
Arequipa	2.5	14	14	14	14
Huánuco	2	10	12	10	12
Huánuco	1	0	11	0	12
Huánuco	0.5	0	11	0	12
Huaraz	5	10	12	10	12
Huaraz	2.5	0	12	0	10
Huaraz	1.25	0	11	0	10
Etanol	96	0	0	0	0
Clorhexidina	0.12	30	19	29	20

Anexo 5

Prueba de normalidad de la distribución

		SMutans	SOralis
N		18	18
Parámetros normales ^{a,b}	Media	7.6667	13.2222
	Desv. Desviación	7.53033	2.90143
Máximas diferencias extremas	Absoluto	0.290	0.330
	Positivo	0.290	0.330
	Negativo	-0.177	-0.133
Estadístico de prueba		0.290	0.330
Sig. asintótica(bilateral)		.000 ^c	.000 ^c

Fuente: Datos proporcionados por el autor

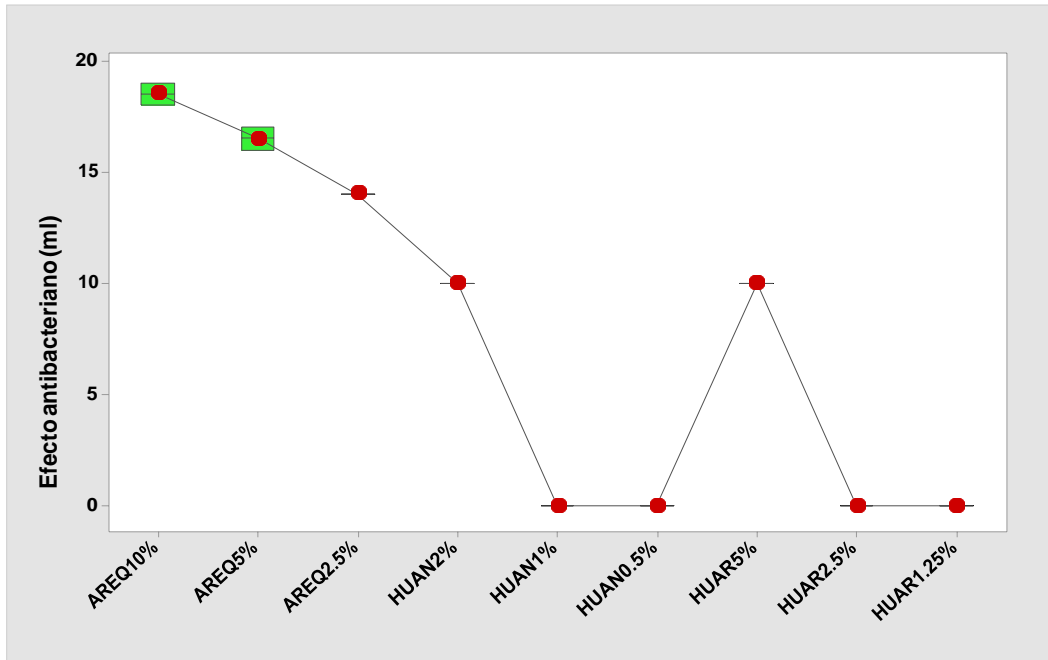
- a. La distribución de prueba es normal.
- b. Se calcula a partir de datos
- c. Corrección de significación de Liliefors

Anexo 6:

GRAFICOS DE TABLAS

Figura 1

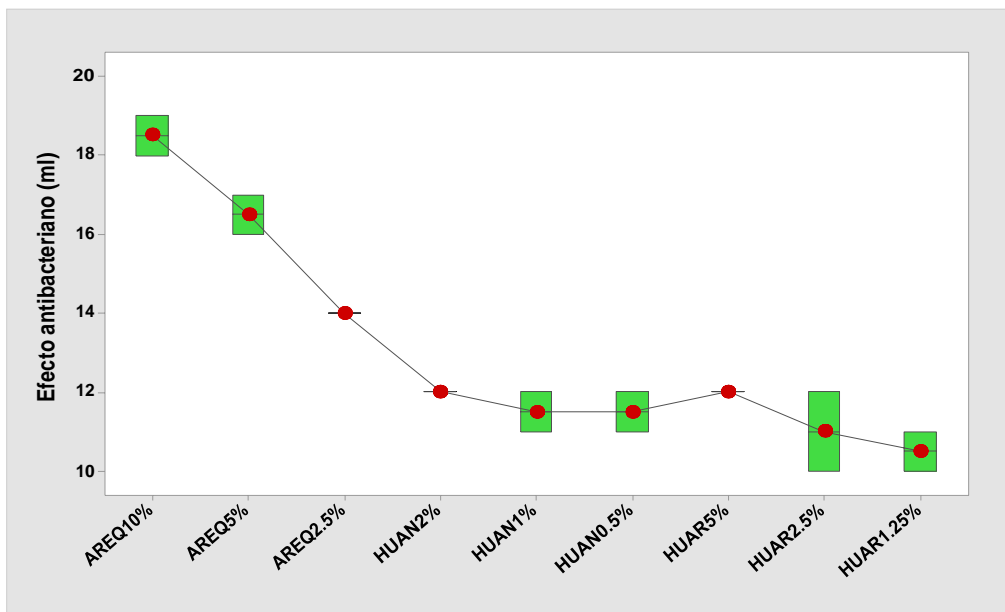
Efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas Streptococcus mutans.



Fuente: Datos proporcionados por el autor

Figura 2

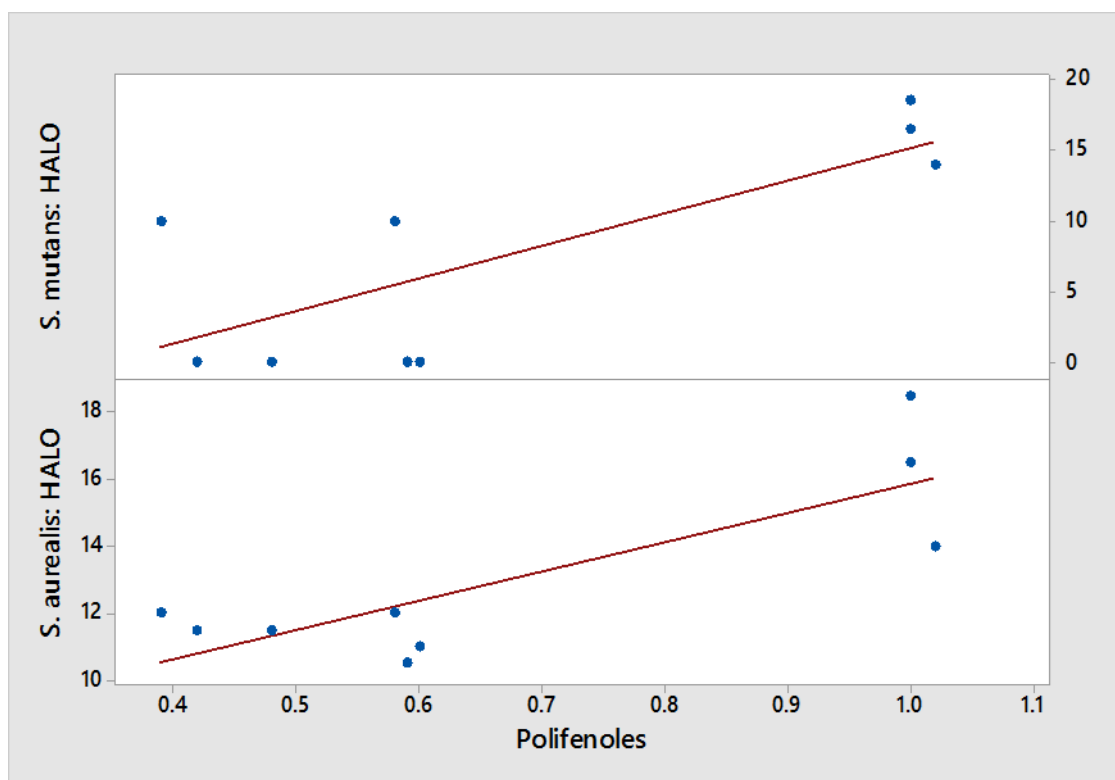
Efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas *Streptococcus oralis*.



Fuente: Datos proporcionados por el autor

Figura 3

Correlación de polifenoles y el efecto antibacteriano de tres propóleos peruanos sobre cepas *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*.

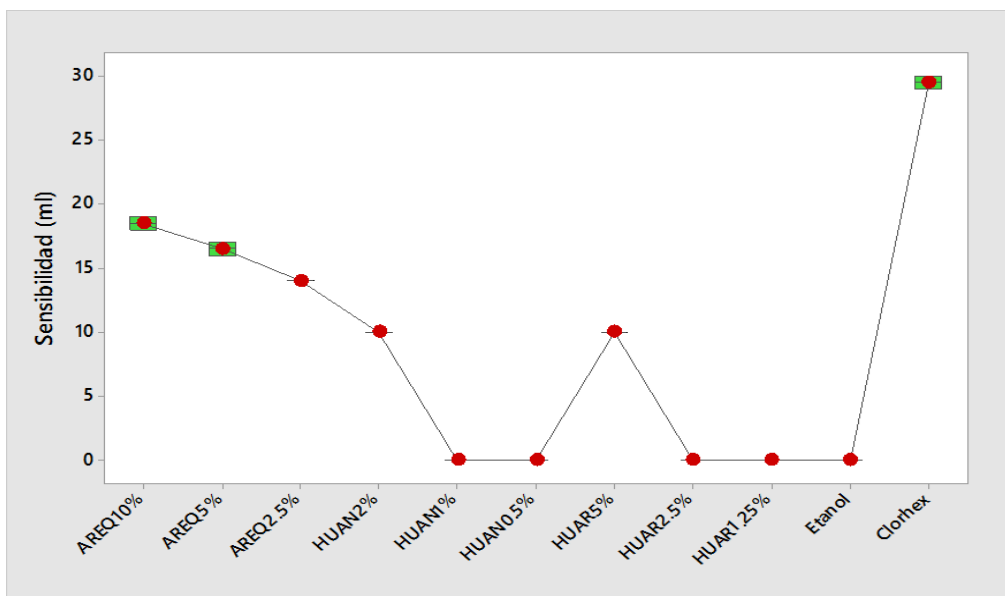


Fuente: Datos proporcionados por el autor

En el gráfico se observa una pendiente positiva, es decir que al aumentar el valor de X (concentración de polifenoles) aumenta el valor de Y (halo de inhibición). Hay que notar que esto no se da en todos y cada uno de los casos, sino que es una tendencia.

Figura 4

Comparación in vitro la actividad antibacteriana entre las concentraciones de tres propóleos peruanos , etanol al 70 % y clorhexidina sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y Streptococcus oralis (ATCC 35037)



Fuente: Datos proporcionados por el autor

Anexo 7

Evidenci

as



Recolección de propóleo, para cual se utilizó un traje especial facilitado por los apicultores. Se utilizó una espátula de plástico para la recolección para evitar contaminaciones de la muestra

Método de preparación del EEP



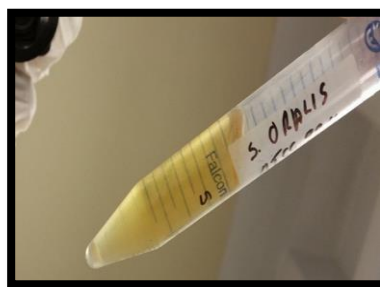
Se trabajó con 10gr de propóleo en 100ml de etanol de 96° donde se observó una mezcla homogénea. Se desinfectaron, rotularon de la A-C y forraron los frascos con papel aluminio a continuación se pesaron en la balanza analítica 10 gr de cada propóleos, utilizando una espátula de acero inoxidable posteriormente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

Caracterización fitoquímica



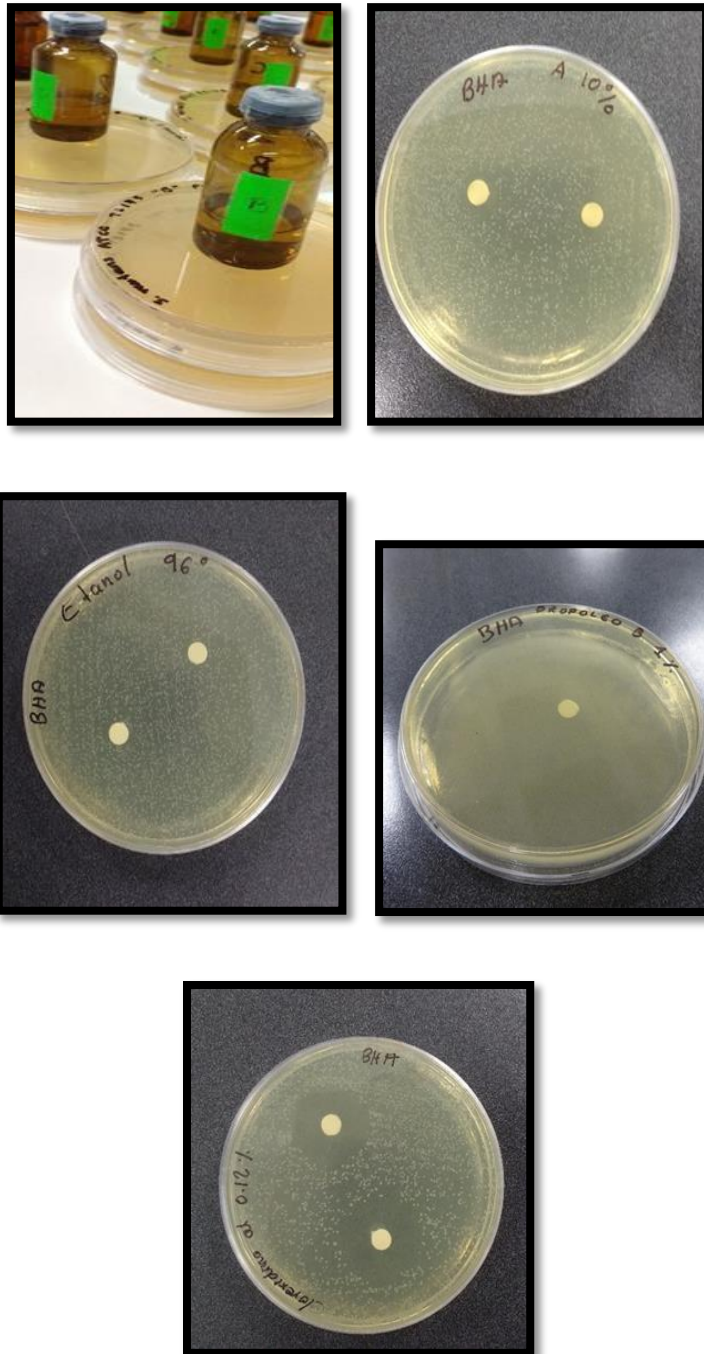
Se realizó la caracterización fitoquímica con los diferentes reactivos. Los reactivos nos indicaban si había presencia o ausencia de las diferentes sustancias naturales como polifenoles, esteroides, taninos etc. Según el grado de coloración se determinaba la coloración. Una vez empleados todos los reactivos se pasó todos los datos a los cuadros para establecer resultados.

Activación de bacterias



Se incubó la cepas de *S. mutans* ATCC 25175 y *S. oralis* ATCC 35037 a 37°C por 24 horas en 2 tubos de BHI conteniendo 6 mililitros cada uno.

Enfrentamiento antibacteriano



En cada placa se colocó dos discos embebidos con el mismo extracto para la replicación del enfrentamiento. Y se utilizó como control positivo a la clorhexidina 0.12% y como control negativo al etanol.