

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



**EFFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE TRES
VARIETADES DE *PRÓPOLIS* FRENTE A *STREPTOCOCCUS*
MUTANS ATCC 25175**

AUTORA:

Bach. ARÉVALO PINEDO, CINDY MINELLY

ASESOR:

Dr. REÁTEGUI NAVARRO, MARCO

COASESORA

Dra. ELVA MEJÍA DELGADO

TRUJILLO – PERÚ

2014

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida, por llenar mi vida de grandes bendiciones, iluminar mi camino con su infinita bondad y sobre todo por permitir que cumpla cada uno de mis metas.

A mis padres Wagner y Nelly, por el amor incondicional que me brindan día a día, por apostar por mí en todo momento. Por ser mi ejemplo a seguir con esa perseverancia, fortaleza y bondad que los caracteriza. Sobre todo por permitir que crezca en un hogar maravilloso.

A mis Profesores, por compartir conmigo y mis compañeros sus conocimientos, experiencias y sobre todo su amistad. Por el tiempo que le dedican a la labor de formar profesionales de éxito.

AGRADECIMIENTO

- ✓ Antes de todo, agradezco infinitamente a Dios, quien me dio la vida, quien me ha llenado de bendiciones y me permite cumplir los sueños, los objetivos y las metas que me voy trazando en la vida. Gracias por darme esa fortaleza y sabiduría que me ha permitido culminar con mis estudios universitarios.

- ✓ A mis padres, hermanos y abuelitos, les agradezco por su amor, confianza y apoyo incondicional. Gracias por darme un hogar lleno de valores, al cual siempre podré regresar. Sobre todo gracias por ser los héroes de mi vida.

- ✓ A mis tíos Teresa y Alberto, por haberme acogido en su hogar durante mi formación académica. Gracias por el aprecio y amor que tienen hacia mí.

- ✓ A mi Asesor Dr. Marco Reátegui Navarro y mi Coasesora Dra. Elva Mejía Delgado por su tiempo, su apoyo, motivación constante, paciencia y aporte académico para la realización de este trabajo de Investigación. Por su compromiso mostrado con mi proyecto y la confianza brindada.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como propósito determinar el tipo de *Própolis* in vitro que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El estudio, prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental se desarrolló en el laboratorio de la sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, e incluyó tres tipos de *Própolis* obtenidos de la parte costa de la Región de La Libertad, Chepen (tipo A), de la Región de San Martín, Moyobamba (tipo B), y de la Región de Ayacucho (tipo C). Se preparó extractos etanólicos de *Própolis* al 10%, los cuales fueron embebidos en discos de papel filtro whatman número 3 previamente esterilizados, posteriormente los discos fueron aplicados en el medio de cultivo Müeller Hinton- sangre inoculados previamente con *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se incubó por 24 y 48 horas, y se tomó la medida del halo de inhibición. Adicionalmente se determinó el efecto bactericida de dicha concentración, mediante el método de dilución en tubos abreviado. Mediante el test estadístico de Kruskal-Wallis se demostró que hay una diferencia de actividad entre las muestras a las 24 y 48 horas, la cual se detalló mediante la prueba de Mann-Whitney donde se obtuvo que a las 24 horas el tipo de *Própolis* A y C no se diferencian entre sí pero si se diferencian de B, obteniendo las dos primeras mejores resultados. A las 48 horas los tres tipos de *Própolis* se diferencian entre sí, siendo el tipo C el que obtuvo mejores resultados seguidos de A y de B, todo esto en cuanto a la medición de los halos de inhibición, mientras que en el conteo de las UFC no se obtuvo diferencias significativas en cuanto a su actividad.

PALABRAS CLAVE: *Própolis*, *Streptococcus mutans*

ABSTRACT

The present study was aimed to determine the type of *Propolis* in vitro that has greater antimicrobial effect against *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Prospective, longitudinal, comparative and experimental study was conducted in the laboratory of microbiology section of the medical school National University of Trujillo, and included three types of *Propolis* obtained from the coast side of the region of La Libertad, Chepen (type A), in the Region of San Martin, Moyobamba (type B), and the Region of Ayacucho (type C). Ethanol extract of *Propolis* 10% was prepared, which were soaked in filter paper disks Whatman No. 3 previously sterilized, whereafter the discs were applied in the culture medium Mueller Hinton-blood inoculated previously with *Streptococcus mutan* ATCC 25175, it was incubated for 24 and 48 hours, and the extent of the zone of inhibition was taken. Additionally, the bactericidal effect of the concentration was determined by the dilution method in tubes abbreviated. Through statistical Kruskal-Walli was shown that there is a difference in activity between 24 and 48 hours, which is explained by the Mann-Whitney where he scored that after 24 hours type *Própolis* A and C not differ from each other but differ from B, obtaining the first two best results. At 48 hours the three types of propolis are differentiated, obtaining with the C type the best performer followed by a and B, this as for measuring the halos of inhibition while the CFU count no significant differences in activity were obtained.

KEYWORDS: *Propolis*, *Streptococcus mutans*

INDICE

| | | |
|-------------|--|-----------|
| I. | INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. | DEL DISEÑO METODOLÓGICO..... | 9 |
| III. | RESULTADOS: | 19 |
| IV. | DISCUSIÓN: | 22 |
| V. | CONCLUSIONES:..... | 26 |
| VI. | RECOMENDACIONES: | 27 |
| VII. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: | 28 |
| | ANEXOS | 32 |

I. INTRODUCCIÓN

El sistema estomatognatico está compuesto por un conjunto de estructuras, ubicadas en su mayoría en la cavidad oral. La cavidad oral posee una de las microfloras más variadas y complejas del cuerpo humano; entre los microorganismos más abundantes se encuentran los principales causantes de la caries dental, como lo es el *Streptococcus mutans*. La caries dental es la enfermedad infectocontagiosa más frecuente a nivel mundial.^{1,2} Por su frecuencia y extensión es considerada por la OMS como la tercera plaga mundial.³ A pesar de los medios utilizados para su prevención, es la enfermedad oral más costosa.^{4,5} Según lo reportado el año 2005 por el Ministerio de Salud, en el Perú, 98 de cada 100 personas presentan lesiones cariosas.⁶

El *Streptococcus mutans* se aísla en el 70 – 90% de la población no desdentada. Por su especial capacidad de colonizar superficies duras se aísla en la cavidad oral, sobre todo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva.⁷ Los *Streptococcus mutans* son cocos Gram+, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos, los cuales miden de 0.5 a 0.8 μm de diámetro. Son anaerobios facultativos, no tienen movimiento y no forman esporas.⁸

Entre sus factores de virulencia se observaron: síntesis de polisacáridos intracelulares, síntesis de polisacáridos extracelulares, movilización de polisacáridos intracelulares, poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, importante capacidad adhesiva, y producción de bacteriocinas con actividad sobre otras bacterias Gram (+).^{5,7,9}

Uno de los métodos de prevención para el desarrollo de esta enfermedad es mediante el uso de productos que sean capaces de actuar frente a los factores de virulencia del *Streptococcus mutans*.^{10,11} En los últimos años, se ha observado un incremento en el uso de productos naturales, debido a los efectos positivos demostrados en la cavidad oral, en cuanto a prevención.⁸

La apiterapia es la disciplina que estudia el cuidado de la salud, el tratamiento y curación de las enfermedades mediante el consumo y aplicación de los productos de la colmena.¹² Durante muchos años una gran cantidad de investigadores se han dado la tarea de estudiar el origen, composición y formas de uso del *Própolis*.^{13,14,15} Dicho producto viene siendo usado hace siglos, tanto por los griegos, los egipcios y los Incas.^{16,17,18}

La palabra *Própolis* se deriva del griego *pro* (en defensa de) y *polis* (la ciudad), es decir “en defensa de la ciudad”. Es un compuesto gomoso – resinoso, elaborado por la abeja, a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales (enzima 13 – glicosidasa). Por lo cual el *Própolis* es considerado un producto de origen mixto, vegetal y animal.^{3,5,6,11,15} Es usado por las abejas para sellar agujeros, fijar paneles de miel, pulir paredes interiores, proteger la entrada de agentes extraños, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena evitando su descomposición, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y evitar vibraciones.^{19,20,21}

El *Própolis* es recolectado por medio de trampas o raspado, siendo el atrapado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación. La recolección se hace antes de

la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales, al inicio de la estación lluviosa, cuando la propolización parece más activa.²²

La composición química del *Própolis* no es estable, varía ampliamente dependiendo del clima, la estación, el tipo de abeja y la ubicación de la colmena.^{23,24,25} Básicamente el *Própolis* contiene un 50% de resinas y vegetales, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% polen y 5% de otras sustancias orgánicas.²⁶ Entre los componentes activos de los *Própolis* más estudiados tenemos flavonoides, fenoles, ácidos cinámicos, ácidos prenilados P-cumárico, isoflavonoides, diterpenos, poliprenilados y bezofenonas. Se ha recomendado tomar en cuenta la fuente de la planta para la tipificación del *Própolis*, lo cual no se ha logrado hasta la actualidad.²⁷

Los estudios realizados reportan que los *Própolis* recolectados en zonas que presentan un clima templado tienen como componente activo a las flavonas y flavonoides, componentes que alteran el potencial de membrana de las bacterias. Mientras que en los *Própolis* recolectados en zonas con climas tropicales se ha encontrado la presencia de terpenoides específicos, ácidos P-cumárico y acetonas.^{6,17}

El disolvente más usado es el Etanol, y aunque hay una tendencia a sustituir el etanol o incorporar los extractos etanólicos secos de *Própolis* en otras formulaciones para reducir al mínimo el efecto irritante del alcohol sobre las membranas mucosas, el *Própolis* es prácticamente insoluble en agua, así que el etanol sigue siendo el disolvente utilizado con más frecuencia para la extracción de *Própolis*.^{13,14,20}

Se le han atribuido propiedades farmacéuticas tales como: cariostático antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, antiúlcero, hepatoprotector, antitumoral, carcinoestático, antiprotozoario, anestésico y de regeneración tisular.^{28,29,30}

Stepanovicet y col.³⁰ utilizaron 13 tipos de *Própolis* de Serbia frente a 39 tipos de microorganismos, bacterias (Gram positivas y Gram negativas) y levaduras. Además evaluaron sinergismo entre antibióticos y *Própolis*. En ambos estudios, obtuvieron inhibición de crecimiento de bacterias y levaduras, y observaron sinergismo entre antibiótico y *Própolis*, como también entre antifúngicos y *Própolis*.

La actividad bacteriostática, bactericida y antiadherente de *Própolis* sobre los microorganismos relacionados con caries dental sugiere su influencia sobre el control de dicha enfermedad.¹⁸ Moreno y cols.⁶ (2007) llevaron a cabo un estudio en el cual se compararon muestras de *Própolis* obtenidas de Argentina, Colombia y Cuba, donde todas las muestras presentaron actividad antimicrobiana. Dos muestra colombianas fueron las que tuvieron mayor efecto a una concentración de 0.02 mg/ml a un tiempo de 48 horas.

Leitão y cols.⁸ (2004) realizaron un estudio comparativo entre el *Própolis* verde de Brasil y *Baccharis dracunculifolia*, frente a los factores cariogénicos del *Streptococcus mutans*. En dicho estudio se encontró que los dos extractos redujeron la producción de ácidos del *Streptococcus mutans* y la eficacia de inhibición dependió de las concentración de los extractos utilizados. El extracto de *Própolis* presentó una actividad máxima inhibitoria a una concentración de 4.0 mg/ml.

Dziedzic y cols.¹⁰ (2013) realizaron un estudio *in vitro* para comprobar el efecto antibacteriano de *Própolis* Polaco frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*. Se encontró que la CMI frente a *Streptococcus mutans* fue de 1.10 ± 0.45 mg/ml, mientras que la CMB fue de 9.01 ± 3.85 mg/ml.

Eguizába y cols.¹⁴ (2007) encontraron que la acción antibacteriana del extracto etanólico de *Própolis* peruano contra *Streptococcus mutans* es mayor que en *Lactobacillus casei*, siendo significativa en las concentraciones de 0.8 y 20%.

Righi y cols.¹⁷ (2013) compararon la composición química de 8 *Própolis* de Brazil, reportando que las cantidades más altas de fenoles y flavonoides se obtuvieron en las muestras provenientes Pirenopolis y Cabo Verde; muestras de Bauru, Ponta Grossa, y Lavras tienen un contenido intermedio de fenoles, además se encontraron derivados cafeoilquinico, fenilpropanoides y flavonas; por último, las muestras de los Picos, Pariquera y Mira Bela, presentaron menor contenido de fenoles totales y superior glucósido de ácido cafeico.

Elbaz y cols.²⁷ (2012) llevaron a cabo un estudio comparativo del efecto antimicrobiano de *Própolis* de Nueva Zelanda y Egipto, frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacilli*. Se encontró que los valores de CIM del extracto etanólico de *Própolis* y las fracciones de hexano y cloroformo en las pastillas de *Própolis* de Nueva Zelanda fueron similares para *Streptococcus mutans* y *Lactobacilli*, con excepción de las fracciones de hexanos para *Lactobacillus*. Los valores de CIM para los *Própolis* egipcios fueron bajos con fracciones de hexanos tanto para *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.

Mayta y cols.²⁹ (2009) encontraron que, tanto a concentraciones del 10 y 30% el *Própolis* presenta la misma actividad antimicrobiana frente a los *Streptococcus mutans*. También se encontró una máxima acción antibacteriana a las 24 horas de incubación.

Considerando la importancia de la prevención de enfermedades orales, reduciendo los factores de virulencia de su principal causante, el *Streptococcus mutans* y conociendo las propiedades antibacterianas del *Própolis*, se realizó el presente trabajo de investigación con el propósito de determinar la variedad de *Própolis* in vitro que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutan*, teniendo en cuenta que la composición del *Própolis* depende de la flora, el clima, el tiempo de recolección y el tipo de abeja, además de la gran biodiversidad de recursos con los que contamos en el Perú.

1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Cuál de las tres variedades de *Própolis* es el que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

2. HIPÓTESIS:

El *Própolis* de Chepén, posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con respecto al *Própolis* de Moyobamba y Ayacucho.

3. OBJETIVOS:

3.1. General:

Determinar la variedad de *Própolis* *in vitro* que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

3.2. Específicos:

- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Chepén frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Moyobamba frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Ayacucho frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Chepén, Moyobamba, Ayacucho frente a *Streptococcus mutan* ATCC 25175.
- Comparar la sensibilidad bacteriana de las tres variedades de *Própolis* frente a *Streptococcus mutan* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.

II. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

1. MATERIAL DE ESTUDIO:

1.1. Tipo de investigación:

| | | | |
|---|---|-------------------------------------|---|
| Según el período en que se capta la información | Según la evolución del fenómeno estudiado | Según la comparación de poblaciones | Según la interferencia del investigador en el estudio |
| Prospectivo | Longitudinal | Comparativo | Experimental |

1.2. Área de estudio:

Laboratorio de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

1.3. Definición de la población muestral:

1.3.1. Características generales:

1.3.1.1. Criterios de inclusión:

- Placas Petri que presenten el caldo de cultivo *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Placas Petri que se encuentren en buenas condiciones y esterilizadas óptimamente.

1.3.1.2. Criterios de exclusión:

- Placas Petri que no hayan seguido el correcto proceso de esterilización.

1.3.1.3. Criterios de eliminación:

- Placas Petri que presenten el crecimiento de cualquier otra bacteria o microorganismo que no sea la de estudio *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Placas de Petri que durante el procedimiento hayan sufrido algún daño físico o deterioro.

1.3.2. Diseño estadístico de muestreo:

1.3.2.1. Unidad de análisis:

Placa Petri con el cultivo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 que cumpla con los criterios de inclusión.

1.3.2.2. Unidad de muestreo:

Placa Petri con el cultivo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 que cumpla con los criterios de inclusión.

1.3.2.3. Marco de muestreo:

No posee marco muestreo por ser un estudio no probabilístico por conveniencia.

1.3.2.4. Tamaño muestral:

El tamaño muestral fue determinado empleando la fórmula que corresponde a comparación de medias:

$$n = \frac{2 * (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Donde:

n = Número de placas Petri por concentración.

$Z_{\alpha/2}$ = 1.960 Valor Z al 5% de error tipo I

Z_{β} = 0.842 Valor Z al 20% de error tipo II

σ Desviación estándar de los halos de inhibición con *Própolis* 10%.

$\mu_1 - \mu_2$ = Diferencia del halo de inhibición entre dos tipos *Própolis*.

Se asume: $\sigma / (\mu_1 - \mu_2) = 1$

Remplazando se tiene:

$$n = 2 * (1.96 + 0.842)^2 * 1^2$$

$$n = 16 \text{ placas}$$

La muestra estará conformada por 16 placas/tipo de *Própolis*.

1.3.3 Método de Selección:

La selección de la muestra se realizará a través de un método no probabilístico, a conveniencia de la investigadora hasta completar el número requerido.

2. MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

2.1. Método: Observación.

2.2. Descripción del procedimiento:

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación fue la obtención del permiso para su ejecución, tras la aprobación del proyecto por parte del comité permanente de investigación de la Escuela Profesional de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego.

Se procedió a solicitar la autorización y a realizar las coordinaciones con la supervisora de procesos operativos del laboratorio para la realización del trabajo de investigación, a quien se le presentó una copia del proyecto y se le explicó el propósito y características del estudio, se estableció un cronograma de visitas al laboratorio para la obtención de mediciones.

Preparación de las cepas bacterianas:

De una placa de cultivo con agar no selectivo (TSA) e incubada por 18 – 24h, se seleccionó colonias aisladas y preparó una suspensión directa en caldo tioglicolato.

La suspensión fue inmediatamente ajustada a la escala 0,5 de Mc. Farland. La suspensión preparada contuvo aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UF/ ml para *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Obtención de las muestras de *Própolis*:

El *Própolis* fue extraído de la parte costa de la Región de la Libertad, Chepén (a esta muestra llamaremos el tipo A), de la Región de San Martín, Moyobamba (tipo B) y la parte sierra de la Región de Ayacucho (tipo C). En estas tres regiones se contactó a un especialista con experiencia en la recolección de este recurso natural. Se separó algunos componentes que no formaban parte de ella como restos pequeños de madera, de hojas y otros, que puedan alterar su composición.

Se transportó el *Própolis* desde el lugar de recolección hacia el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

Preparación del extracto etanólico de *Propólisis* (EEP)

Para la preparación del Extracto Etanólico del *Própolis* (EEP), los *Própolis* de las tres regiones fueron extendidos sobre una mesa y fueron seleccionados aquellos que no presentaron impurezas, luego fueron cortado en trozos pequeños y se pesaron y separaron en grupos de 50 g de *Propólisis* de cada región, estos se vertieron en un cartucho de papel de filtro y se

colocó en el extractor del equipo de soxhlet, los cuales fueron extraídos con 150 mL de etanol al 70° a una temperatura de 60°C durante 4 horas, este proceso se repitió por 3 veces.

El producto se filtró varias veces con papel de filtro Whatman N°1 y se obtuvo los extractos etanólicos de *Propólis* de cada región. Estos extractos fueron concentrados en un rotavapor hasta obtener un extracto seco. A partir de este extracto se preparó las concentraciones al 10 % de *Propólis*.

Incubación de las placas:

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotamos el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para remover el exceso de inóculo.

Se inoculó la superficie seca de 12 placas de Müeller Hinton más sangre de conejo al 10%, estirando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Dejamos secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

Aplicación del EET:

Inoculada la placa de Müeller Hinton- sangre con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Se preparó discos de papel filtro whatman número 3 estériles, los cuales fueron embebidos con 60 ul de EEP al 10%. Contamos con tres EEP al 10%,

a los cuales clasificamos como tipo A (Chepén), tipo B (Moyobamba) y tipo C (Ayacucho).

Con una aguja estéril, los discos fueron colocados sobre las placas de Mueller Hinton- sangre con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Inoculando 4 placas por tipo de *Própolis*.

Incubación:

Se incubó las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de las sustancias a evaluar. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 horas en microanaerobiosis utilizando jarra Gaspak y con el método de la vela.

Después del tiempo de incubación 24 a 48 horas se examinó cada placa y se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

Lectura de las placas e interpretación de los resultados:

La zona de inhibición es definida como el diámetro de las zonas de inhibición completa (borde externo del disco o pozo hasta el borde mas interno del halo de inhibición), usando el calibrador con una precisión de 0.5 mm. (Se registraron en los instrumentos de recolección de datos (Anexo 1). Se reportó el valor promedio y la desviación estándar de las 16 lecturas de zona de inhibición para cada sustancia a evaluar.

Determinación del efecto bactericida del *Própolis* al 10% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Para la determinación del efecto bactericida se realizó el método de dilución en tubos abreviado. Se prepararon seis tubos de ensayo (dos por muestra), las cuales corresponden al EEP al 10% obtenido del tipo A, al EEP al 10% obtenido del tipo B y al EEP al 10% obtenido del tipo C, se añadió 0.8 mL de cada concentración, luego se realizó la inoculación de 0,2 mL de la bacteria (en concentraciones semejantes al tubo 0.5 de la escala de MacFarland) en cada uno de los tubos correspondientes, conteniendo las concentraciones mencionadas; Luego los tubos fueron incubados a 37 °C por 24 horas en microanaerobiosis. Posteriormente, se determinó las cuentas viables sembrando 0.1ml de solución de cada uno de los tubos en 16 placas con agar Mueller Hinton- sangre por cada concentración, utilizando el asa de Driglasky para dispersar la muestra; dichas placas se colocaron en la estufa por 24 horas a 37°C y luego se observó el crecimiento del microorganismo mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias, considerándose el efecto bactericida al tratamiento en el cual no se observara UFC. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10cm de la llama de un mechero.

2.3. Instrumento de recolección de datos:

Para la recolección de datos, se utilizó fichas elaborada de acuerdo a los objetivos planteados en el estudio (Anexo 1 y 2).

3. VARIABLES:

| VARIABLE | DEFINICION CONCEPTUAL | DIMENSIONES | DEFINICION OPERACIONAL E INDICADORES | TIPO | | ESCALA DE MEDICIÓN |
|--|--|---------------------------------------|--|---------------------|------------------|--------------------|
| | | | | SEGÚN SU NATURALEZA | SEGÚN SU FUNCION | |
| PRÓPOLIS | Compuesto gomo-resinoso, elaborado por las abejas, a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales. Cuyo principales componentes son los flavonoides los cuales poseen efecto antimicrobiano | ----- | Según el lugar de donde se obtuvo el <i>Própolis</i> : Tipo A 10% Tipo B 10% Tipo C 10% | Cualitativa | Independiente | Ordinal |
| EFECTO ANTIMICROBIAN O SOBRE EL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175 | Bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana o biofilm dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. | Sensibilidad o resistencia bacteriana | Medición en milímetros del halo de inhibición. | Cuantitativa | Dependiente | Razón |
| | | Efecto bactericida | Se medirá a través del conteo unidades formadoras de colonias (UFC) | Cuantitativa | | Razón |
| TIEMPO | magnitud física con la que medimos la duración de acontecimientos de los sistemas sujetos a observación | _____ | 24 Horas 48 Horas | Cuantitativa | Independiente | Ordinal |

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN:

La información fue incorporada en una base de datos elaborada en el Software IBM SPSS Statistics 19, para ser procesados y presentados en tablas con medias y desviación estándar.

El efecto antimicrobiano de las tres variedades de *Própolis* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue comparado empleando la prueba de Kruskal-Wallis en los halos de inhibición y Unidades Formadoras de Colonias. La prueba fue complementada con la prueba de Mann-Whitney.

Se optó por usar pruebas no paramétricas, ya que el presente estudio no cumplió con los parámetro de normalidad requeridos para la aplicación de las pruebas paramétricas.

La significancia estadística será considerada al 5%.

III. RESULTADOS:

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el tipo de *Própolis* in vitro que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se compararon 3 tipos de *Própolis* provenientes de Chepén (tipo A), Moyobamba (tipo B) y Ayacucho (tipo C), para cada tipo de *Própolis* se realizó 16 repeticiones, obteniéndose los siguientes resultados:

A través de la prueba de Kruskal-Wallis, quien nos permite compara de 3 a más variables, se demuestra que hay diferencia de actividad antimicrobiana entre las 24 y 48 horas. Mediante la prueba de Mann-Whitney, se puede detallar que: el *Própolis* tipo A y C, se diferencian del *Própolis* tipo B, presentando las dos primeras mayor diámetro en cuanto al halo de inhibición; A las 48 horas, los 3 tipos de *Própolis* se diferencian en cuanto a la medición de halo de inhibición, registrando el tipo C mayor diámetro, seguido del tipo A, y finalmente el tipo B. En cuanto al conteo de la Unidades Formadoras de Colonias, los tres tipos de *Própolis* registran los mismos resultados. (TABLA 1)

En el *Própolis* tipo A, el diámetro del halo de inhibición a las 24 horas, presentó una media de 13,91 y una desviación estándar de 0,80. Mientras que a las 48 horas, presentó una media de 17,06 y una desviación estándar de 1,91. Entretanto el conteo de Unidades Formadoras de colonias, presentó una media de 1,44 y una desviación estándar de 0,50. (TABLA 2)

En el *Própolis* tipo B, el diámetro del halo de inhibición a las 24 horas, presentó una media de 7,38 y una desviación estándar de 0,50. Mientras que a las 48 horas, presentó una media de 7,88 y una desviación estándar de 0,62. Entretanto el conteo de Unidades Formadoras de colonias, presentó una media de 1,38 y una desviación estándar de 1,93. (TABLA 3)

En el *Própolis* tipo C, el diámetro del halo de inhibición a las 24 horas, presentó una media de 14,50 y una desviación estándar de 1,58. Mientras que a las 48 horas, presentó una media de 23,69 y una desviación estándar de 1,54. Entretanto el conteo de Unidades Formadoras de colonias, presentó una media de 0,63 y una desviación estándar de 1,26. (TABLA 4)

TABLA 1

Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* tipo A, B y C frente a *Streptococcus mutan* ATCC 25175

| | Halo de inhibición (24 h) | | | Halo de inhibición (48 h) | | | UFC | | |
|-----------------|---------------------------|------|-------|---------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| Media | 13,91 | 7,38 | 14,50 | 17,06 | 7,88 | 23,69 | 1,44 | 1,38 | 0,63 |
| DE | 0,80 | 0,50 | 1,58 | 1,91 | 0,62 | 1,54 | 1,93 | 1,93 | 1,26 |
| Mediana | 14,00 | 7,25 | 14,50 | 17,00 | 8,00 | 24,00 | 0,50 | 1,00 | 0,00 |
| Rango medio | 30,44 | 8,50 | 34,56 | 24,56 | 8,50 | 40,44 | 25,59 | 27,44 | 20,47 |
| Kruskall-Wallis | 32,604 | | | 42,164 | | | 2,505 | | |
| p | 0,000 | | | 0,000 | | | 0,286 | | |
| Mann-Whitney | b | a | b | b | a | c | a | a | a |

valor de P: 0.5

TABLA 2

Efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* tipo A frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| | Halo de inhibición (mm) | | UFC |
|---------|-------------------------|-------|------|
| | 24 h | 48 h | |
| Media | 13,91 | 17,06 | 1,44 |
| DE | 0,80 | 1,91 | 1,93 |
| Mediana | 14,00 | 17,00 | 0,50 |

valor de P: 0.5

TABLA 3

Efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* tipo A frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| | Halo de inhibición (mm) | | UFC |
|---------|-------------------------|------|------|
| | 24 h | 48 h | |
| Media | 7,38 | 7,88 | 1,38 |
| DE | 0,50 | 0,62 | 1,93 |
| Mediana | 7,25 | 8,00 | 1,00 |

valor de P: 0.5

TABLA 4

Efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* tipo A frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| | Halo de inhibición (mm) | | UFC |
|---------|-------------------------|-------|------|
| | 24 h | 48 h | |
| Media | 14,50 | 23,69 | 0,63 |
| DE | 1,58 | 1,54 | 1,26 |
| Mediana | 14,50 | 24,00 | 0,00 |

valor de P: 0.5

IV. DISCUSIÓN:

La apiterapia es una práctica que se ha utilizado desde tiempos remotos, esto obliga a los investigadores a llevar a cabo diversos estudios mediante los cuales se puede comprobar los efectos positivos que los productos apícolas podrían tener en la salud. Dentro de los productos más estudiados se encuentra el *Própolis* al cual se le atribuye diversas propiedades, entre ellas su efecto antimicrobiano.

El propósito de esta investigación fue determinar el tipo de *Própolis* in vitro que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Para determinar la sensibilidad o resistencia bacteriana, se utilizó el sistema de difusión de discos, registrando promedios de halos de inhibición. A las 24 horas, el *Própolis* tipo A y C presentaron el mismo promedio de halo de inhibición, el cual fue mayor al promedio presentado por el tipo B. A las 48 horas, se observó diferencia en el efecto de los tres tipos de *Própolis*, registrando el promedio más alto el tipo C, seguido del tipo A y finalmente el tipo B.

Se determinó el efecto bactericida de la concentración estudiada, mediante el método de dilución en tubos abreviados, usando el extracto etanólico de *Própolis* al 10%, obteniendo que los 3 tipos de *Própolis* presentan efecto bactericida. En un estudio similar realizado por Moreno y cols⁶ (2007), donde se compararon muestras de *Própolis* obtenidas de Argentina, Colombia y Cuba; se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con la ayuda de 10 tubos

de ensayo con 2 ml de caldo y agar en cada uno, al primero le añadieron 2 ml del extracto de *Própolis* y se realizaron diluciones seriadas en base dos, obteniendo diluciones entre 15 y 0.02 mg/ml de *Própolis*. Todas las muestras presentaron actividad antimicrobiana, al igual que en el estudio presentado. Las muestras colombianas registraron un mejor efecto tanto a las 24 como a las 48 horas, pasando de 0.93 a 0.02 mg/ml, los *Própolis* argentinos pasaron de 0.43 a 0.23 mg/ml, mientras que los *Própolis* Cubanos se mantuvieron en el tiempo. De tal manera en éste estudio se demostró, a través de la resistencia bacteriana que las 24 horas el *Própolis* tipo A y C presentan mayor resistencia que B, pero a las 48 horas el tipo C incrementa su resistencia más que los tipos A y B.

En el presente estudio se trabajó con concentraciones de extracto etanólico de *Própolis* al 10% obteniendo actividad antimicrobiana en todas las muestras, las cuales variaron de acuerdo al tipo de *Própolis*, dicha variación se puede atribuir a que las muestras fueron obtenidas de lugares con plantaciones distintas. En un estudio realizado por Leitão y cols⁸ (2004) se comparó el efecto antibacteriano del *Própolis* verde de Brasil y *Baccharis dracunculifolia*, frente a algunos factores de virulencia de *Streptococcus mutans*. El propósito de este estudio fue demostrar el efecto antimicrobiana de *Baccharis dracunculifolia*, a quien fácilmente se le puede atribuir la acción que presenta el *Própolis* recolectado de la zona en la cual esta especie abunda, ya que dicho producto es considerado de origen mixto (animal y vegetal). Los dos agentes registraron mayor y similar actividad a una concentración de 4.0 mg/ml, demostrando así que hay una gran

relación entre el *Própolis* y la plantación de la zona en el cual es fabricado, pudiendo justificar de esta manera los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En contraste con el estudio realizado por Eguizába y col¹⁴ (2007) donde se encontró que la acción antibacteriana del extracto etanólico de *Própolis* peruano contra *Streptococcus mutans* fue significativa en las concentraciones de 0.8 y 20%. En el presente estudio, se utilizó una concentración del 10%, la cual fue efectiva para comprobar la acción antimicrobiana de los *Própolis* estudiados.

Los resultados obtenidos en éste estudio demostraron que la actividad antimicrobiana de los *Própolis* varía de acuerdo a la zona de recolección, obteniendo diferencias entre los 3 a las 48 horas, lo cual nos hace suponer que su composición química no es la misma y/o las concentraciones de estas sustancias varían entre los *Própolis* estudiados. Righi y cols¹⁷ (2013), en su estudio nos demuestran que esto es posible, ya que compararon la composición química de 8 *Própolis* de Brazil, reportando que: las cantidades más altas de fenoles y flavonoides se obtuvieron en las muestras provenientes Pirenopolis y Cabo Verde; muestras de Bauru, Ponta Grossa, y Lavras tienen un contenido intermedio de fenoles, además se encontraron derivados cafeoilquinico, fenilpropanoides y flavonas; por último, las muestras de los Picos, Pariquera y Mira Bela, presentaron menor contenido de fenoles totales y superior glucósido de ácido cafeico. Sería recomendable realizar estudios mediante los cuales se pueda determinar la composición química y las concentraciones de las mismas en los diversos tipos de *Própolis* recolectados en el territorio nacional.

El comportamiento distinto de las variedades de *Própolis*, en cuanto a su efecto antimicrobiano, fue demostrado a través de los resultados obtenidos en el presente estudio, al igual que en el estudio realizado por Elbaz y cols²⁷ (2012), donde se encontró que los valores de CIM del extracto etanólico de *Própolis* y las fracciones de hexano y cloroformo, en las pastillas de *Própolis* de Nueva Zelanda fueron similares para *Streptococcus mutans* y *Lactobacilli*, mientras que los valores de CIM para los *Própolis* egipcios fueron bajos con fracciones de hexanos tanto para *Streptococcus mutans* y *Lactobacillis*.

Se puede asegurar que a la concentración del 10% el extracto etanólico de *Própolis* ya presenta actividad antimicrobiana, actividad que se evidencia a las 24 horas e incrementa a las 48 horas, resultado que difiere de lo encontrado por Mayta y cols²⁹ (2009) quienes obtuvieron la máxima actividad antimicrobiana a las 24 horas a concentraciones de 10 y 30%.

V. CONCLUSIONES:

1. El *Própolis* de Ayacucho posee mayor efecto antimicrobiando frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175
2. Los *Própolis* de Chepén, Moyobamba y Ayacucho poseen efecto antimicrobiando frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
3. A las 24 horas, el *Própolis* de Chepén y Ayacucho poseen mayor efecto antimicrobiano que el *Própolis* de Moyobamba frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
4. A las 48 horas, el *Própolis* de Ayacucho posee mayor efecto antimicrobiano, seguido del *Própolis* de Chepén y finalmente el *Própolis* de Moyobamba frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

VI. RECOMENDACIONES:

1. Realizar estudios in vitro usando el extracto etanólico de *Própolis* frente a otros microorganismos.
2. Realizar estudios que determinen los componentes activos de los *Própolis* procedente de diversas zonas del país.
3. Realizar estudios en medios acuosos (saliva) y en animales con *Própolis* recolectados en el territorio nacional.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Laserna V. Higiene Dental Personal Diaria, La Correcta Higiene Dental Personal Diaria Es La Base De La Prevención De Las Enfermedades Dentales. Canadá: ISBN Victoria; 2008.
2. Koo H, Rosalen P, Cury J, Bowen W. Effects Of Compounds Found In *Propolis* On *Streptococcus mutans* Growth And On Glucosyltransferase Activity. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2002; 46 (5) : 1302-1309.
3. Jeon J, Rosalen P, Falsetta M, Koo H. Natural Products In Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenge And Future Perspective. *Caries Res*. 2011; 45(3): 243-63.
4. Liberio S, Pereira A, Araújo M, Dutra R, Nascimento F, Monteiro-Neto V, et al. The Potential Use Of *Propolis* As A Cariostatic Agent And Its Actions On *Mutans* Group *Streptococci*. *J Ethnopharmacol*. 2009 Aug 17; 125(1):1-9.
5. minsa.gob.pe [internet]. Perú; 2005. [actualizado 18 jul 2005; citado 26 mar 2014]. Disponible en: http://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13
6. Moreno H, Martínez A, Figueroa J. Efecto Antimicrobiano *In Vitro* De Propóleos Argentinos, Colombianos Y Cubano Sobre *Streptococcus mutans* ATCC. 25175. ISSN. 2007;5(7): 1794-2470.
7. Liébana J. Microbiología oral. 2º edición. McGraw – Hill .Granada: Interamericana; 2002.
8. Leitão D, Filho A, Polizello A, Bastos J, Spadaro A. Comparative Evaluation Of *In Vitro* Effects Of Brazilian Green *Propolis* And *Baccharis dracunculifolia*

- Extracts On Cariogenic Factors Of *Streptococcus mutans*. Biol Pharm Bull. 2004 Nov; 27(11):1834-9.
9. Vecchi E, Drago L. Attività Antimicrobica Della Propoli: Cosa C'è Di Nuovo? Propolis Antimicrobial Activity: What's New?. Infez Med. 2007; 15(1): 7-15.
 10. Dziedzic A, Kubina R, Wojtyczka R, Kabała-Dzik A, Tanasiewicz M, Morawiec T. The Antibacterial Effect of Ethanol Extracto Of Polish *Propolis* on *Muntans Streptococci* and *Lactobacilli* Isolated From Saliva. Evid Based Complement Alternat Med [internet]. 2013[citado 29 mar 2014]; 2013:681891.
 11. Del Rio P. Actividad Biocida De Un *Propolis* Chileno Frente a *Porphyromonas gingivalis*. Estudio In Vitro [Tesis]. Santiago – Chile: Universidad De Chile; 2006.
 12. Aricapa P. Actividad Antimicrobiana De Plantas Sobre Microorganismos Cariogènicos. Bogota: Pontifica Universidad Javeriana; 2009. [Citado 26 mar 2014]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis324.pdf>
 13. Sforcin J, Bankova V. *Propolis*: Is There A Potential For The Development Of New Drugs?. J Ethnopharmacol. 2011 ene; 133(2):253-60.
 14. Eguizábal M, Moromi H. Actividad Antibacteriana *In Vitro* Del Extracto Etanólico De Propóleo Peruano Sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Rev Odontol Sanmarquina. 2007; 10(2):18-20.
 15. Bankova V. Chemical Diversity Of *Propolis* And The Problem Of Standardization. J Ethnopharmacol. 2005 Aug 22; 100(1-2):114-7.

16. Bravo A. Tratamiento De La Alveolitis Dental Con Tintura De Propóleo Al 5%.
Rev Cubana Farm. 2012; 46(1): 97-104.
17. Righi A, Negri G, Salatino A. Comparative Chemistry Of *Propolis* From Eight
Brazilian Localities. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 2013: 14.
18. Duarte S, Koo H, Bowen W, Hayacibara M, Cury J, Ikegaki M, Rosalen
P. Effect Of Novel Type Of *Propolis* And Its Chemical Fractions On
Glucosyltransferases And On Growth And Adherence Of *Mutans Streptococci*.
Boil. Biol Pharm Bull. 2003 Apr; 26(4): 527-31.
19. Daugsc A, Cleber S, Yong K. Brazilian Red *Propolis* – Chemical Composition
And Botanical Origin. Evid Based Complement Alternat Med. 2008; 5(4): 435–
41.
20. Sawaya A, Barbosa da Silva I, Marcucci M. Analytical Methods Applied To
Diverse Types Of Brazilian *Propolis*. Chem Cent J. 2011 Jun 1; 5(1): 27.
21. Lessio M, Vilela W, Zauli R, Ikegaki M, Rehder V, Foglio M, de Alencar
S, Rosalen P. Bioassay Guided Purification Of The Antimicrobial Fraction Of A
Brazilian *Propolis* From Bahia State. BMC Complement Altern Med. 2009 Jul
30; 9:25.
22. Farré R. El *Própolis* Y La Salud. Ars Pharmaceutica, 2004; 45 (1): 21-43.
23. Palomino G. Determinación Del Contenido De Fenoles Y Evolución De La
Actividad Antioxidante De Propóleos Recolectados En El Departamento De
Antioquia (Colombia) Universidad De Antioquia Colombia. Vitae 2009; 16(3):
388 – 395.

24. Koo H, Rosalen P, Cury J, Ambrosano G, Murata R, Yatsuda R, Ikegaki M, Alencar S, Park Y. Effect Of A New Variety Of *Apis Mellifera Propolis* On *Mutans Streptococci*. *Curr Microbiol*. 2000 Sep; 41(3):192-6.
25. Premoli G. Uso Del Propóleo En Odontología. *Acta Odontológica Venezolana* 2010; 48. Disponible en: www.actaodontologica.com
26. Bedascarrasbure E. Contenido De Fenoles Y Flavonoides Del Propóleo Argentino. *Acta Farm Bonaerense* 2004; 23 (3): 369 – 72.
27. Ghada A, Iman I. Comparison Of The Antimicrobial Effect Of Egyptian *Propolis* Vs New Zeland *Propolis* On *Streptococcus mutans* And *Lactobacilli* In Saliva. *Oral Health Prev Dent*. 2012; 10(2):155-60.
28. Lozina A. Estandarización Y Caracterización Organoléptica Y Físico-Química De 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal Of Pharmacy*.2010; 29 (1): 102 – 10.
29. Mayta F. Evaluación *In Vitro* Del Efecto Antibacteriano Del Extracto Etanólico De Propoleo De Oxapamapa – Perú Sobre Cultivos De *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Rev. EstomatolHeredianan* 2010; 20 (1): 19 – 24.
30. Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic S. In Vitro Antimicrobial Activity Of *Propolis* And Synergism Between *Propolis* And Antimicrobial Drugs. *Microbiol Res*. 2003; 158(4):353-7.

ANEXOS

ANEXO 1

Determinación del Halo de Inhibición

| Nº PLACA | TIPO A (mm) | | TIPO B (mm) | | TIPO C (mm) | |
|----------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| | 24 Hrs. | 48 Hrs. | 24 Hrs. | 48 Hrs. | 24 Hrs. | 48 Hrs. |
| 01 | | | | | | |
| 02 | | | | | | |
| 03 | | | | | | |
| 04 | | | | | | |
| 05 | | | | | | |
| 06 | | | | | | |
| 07 | | | | | | |
| 08 | | | | | | |
| 09 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |
| 15 | | | | | | |
| 16 | | | | | | |

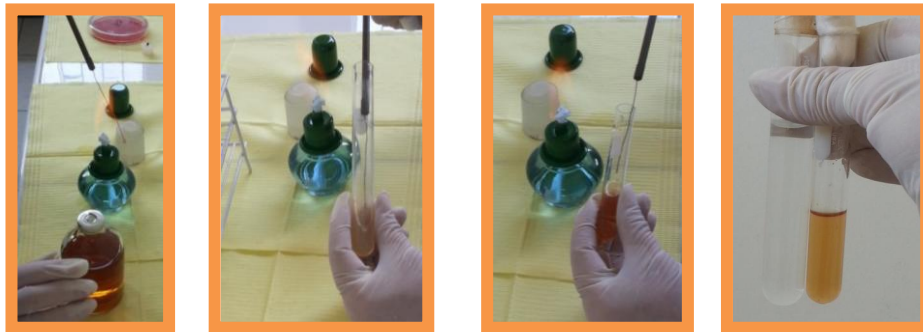
ANEXO 2

Conteo de Unidades Formadoras de Colonias

| Nº PLACA | UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS | | |
|----------|---------------------------------|--------|--------|
| | TIPO A | TIPO B | TIPO C |
| 01 | | | |
| 02 | | | |
| 03 | | | |
| 04 | | | |
| 05 | | | |
| 06 | | | |
| 07 | | | |
| 08 | | | |
| 09 | | | |
| 10 | | | |
| 11 | | | |
| 12 | | | |
| 13 | | | |
| 14 | | | |
| 15 | | | |
| 16 | | | |

ANEXO 3

Preparación de las cepas bacteriana



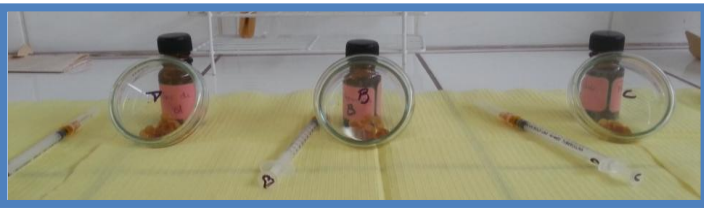
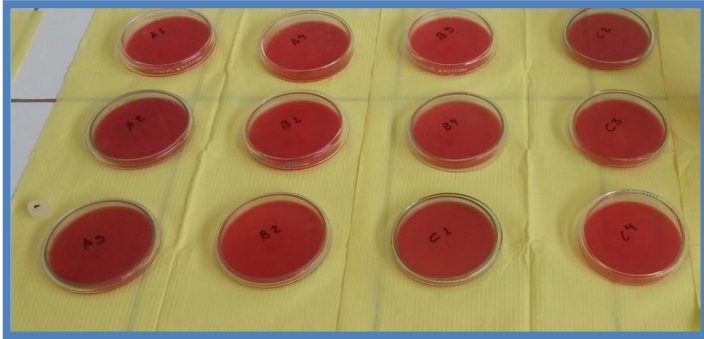
Própolis



Preparación del Extracto Etanólico de Própolis

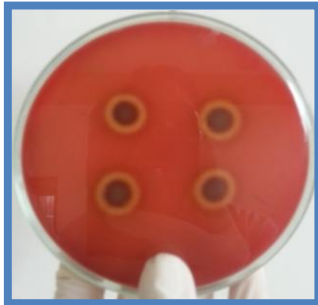


Incubación de las Placas y Aplicación del Extracto Etanólico de *Própolis*

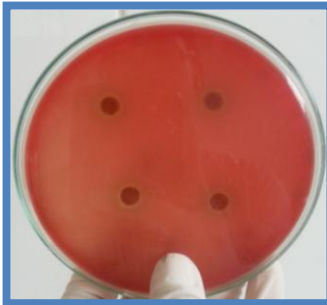


Lectura de Placa

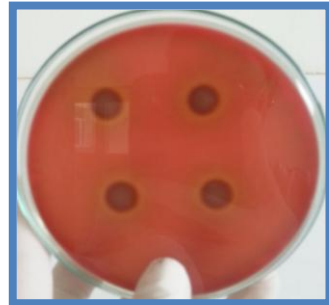
24 Hrs.



A

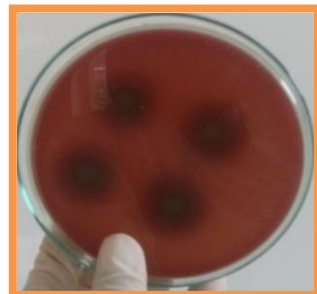
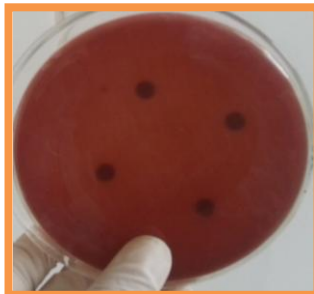


B



C

48 Hrs.



Determinación del Efecto Bactericida





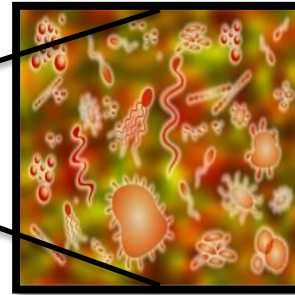
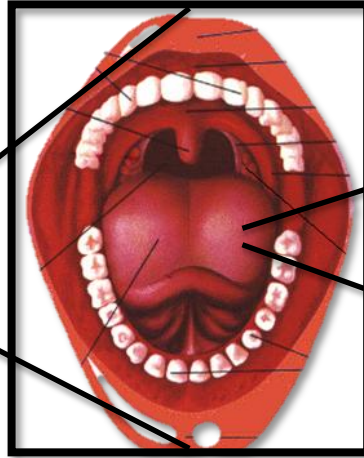
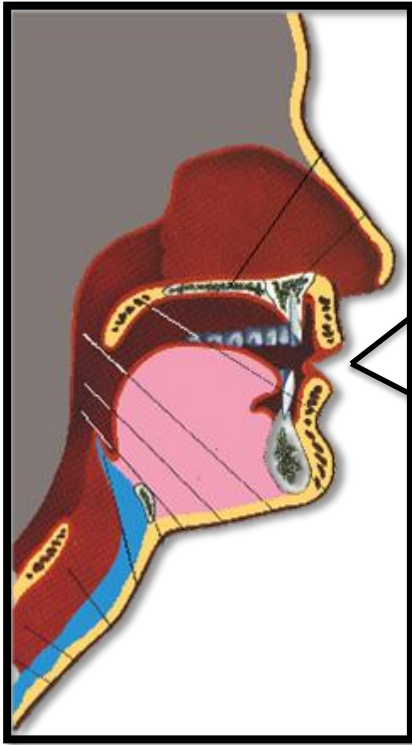
UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA

“EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO*
DE TRES VARIEDADES DE *PRÓPOLIS*
FRENTE A *STREPTOCOCCUS*
***MUTANS* ATCC 25175”**

Autor : Bach. ARÉVALO PINEDO, CINDY MINELLY
Asesor : Doc. REÁTEGUI NAVARRO, MARCO

PLAN DE INVESTIGACIÓN
A. EL PROBLEMA

FUNDAMENTO TEÓRICO

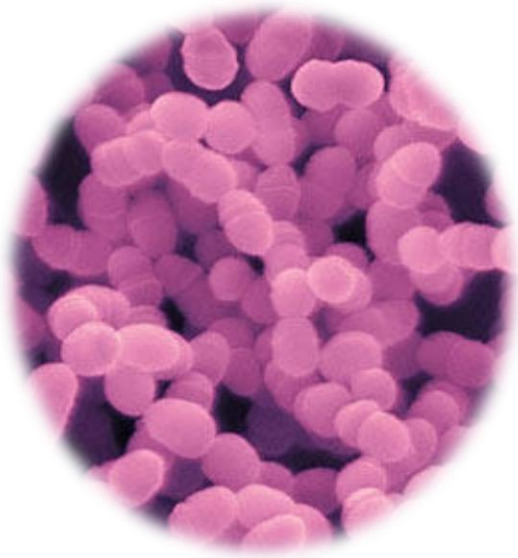


C
A
R
I
E
S

STREPTOCOCCUS MUTANS



FUNDAMENTO TEÓRICO



STREPTOCOCCUS MUTANS

- ✓ Características
 - ✓ Factores de virulencia

PLAN DE INVESTIGACIÓN
A. EL PROBLEMA

FUNDAMENTO TEÓRICO



FUNDAMENTO TEÓRICO



Própolis

- ✓ Etimología
- ✓ Función en la colmena
 - ✓ Composición
- ✓ Propiedades



PLAN DE INVESTIGACIÓN

A. EL PROBLEMA

FUNDAMENTO TEÓRICO

Moreno y cols. (2007) → compararon muestras de *Própolis* → Argentina, Colombia y Cuba. Dos muestra Colombianas tuvieron mayor efecto a una concentración de 0.02 mg/ml a un tiempo de 48 horas

Leitão y cols. (2004) → Estudio comparativo entre el *Própolis* verde de Brasil y *Baccharis dracunculifolia*, frente a los factores cariogénicos del *Streptococcus mutans*. los dos extractos redujeron la producción de ácidos del *Streptococcus mutans*. El extracto de *Própolis* presento una actividad máxima inhibitoria a una concentración de 4.0 mg/ml.

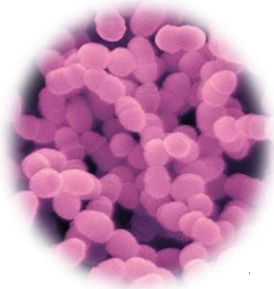
Eguizába y cols. (2007) → acción antibacteriana del extracto etanólico de *Própolis* peruano contra *Streptococcus mutans* es mayor que en *Lactobacillus casei*, siendo significativa en las concentraciones de 0.8 y 20%.

Mayta y cols. (2009) → 10 y 30% el *Própolis* presenta la misma actividad antimicrobiana frente a los *Streptococcus mutans*. Máxima acción antibacteriana a las 24 horas de incubación

PLAN DE INVESTIGACIÓN

A. EL PROBLEMA

JUSTIFICACION:



Considerando la importancia de la prevención de enfermedades orales, reduciendo los factores de virulencia de su principal causante, el *Streptococcus mutans* y conociendo las propiedades antibacterianas del *Própolis*, se realizó el presente trabajo de investigación con el propósito de determinar la variedad de *Própolis* in vitro que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutan*, teniendo en cuenta que la composición del *Própolis* depende de la flora, el clima, el tiempo de recolección y el tipo de abeja, además de la gran biodiversidad de recursos con los que contamos en el Perú.



FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Cuál de las tres variedades de *Própolis* es el que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175?



HIPÓTESIS



El *Própolis* de Chepén, posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con respecto al *Própolis* de Moyobamba y Ayacucho.

OBJETIVOS

General

Determinar la variedad de *Própolis* in vitro que posee mayor efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

Específicos



→→→ Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Chepén frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

→→→ Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Moyobamba frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

→→→ Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Ayacucho frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

→→→ Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* del *Própolis* de Chepén, Moyobamba y Ayacucho frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

→→→ Comparar la sensibilidad bacteriana de las tres variedades de *Própolis* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 y 48 horas.

PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MATERIAL DE ESTUDIO

Tipo de Investigación

| | | | |
|---|---|-------------------------------------|---|
| Según el período en que se capta la información | Según la evolución del fenómeno estudiado | Según la comparación de poblaciones | Según la interferencia del investigador en el estudio |
| Prospectivo | Longitudinal | Comparativo | Experimental |

PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MATERIAL DE ESTUDIO

Área de Estudio

Laboratorio de la Sección
de Microbiología de la
Facultad de Medicina de la
Universidad Nacional de
Trujillo.



MATERIAL DE ESTUDIO

Definición de la Población Muestral

Características
Generales

Criterios de Inclusión

- ✓ Placas Petri que presenten el caldo de cultivo *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- ✓ Placas Petri que se encuentren en buenas condiciones y esterilizadas óptimamente.

MATERIAL DE ESTUDIO

Definición de la Población Muestral

Características
Generales

Criterios de Exclusión

- ✓ **Placas Petri que no hayan seguido el correcto proceso de esterilización.**

MATERIAL DE ESTUDIO

Definición de la Población Muestral

Características
Generales

Criterios de Eliminación

- ✓ Placas Petri que presenten el crecimiento de cualquier otra bacteria o microorganismo que no sea la de estudio *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- ✓ Placas de Petri que durante el procedimiento hayan sufrido algún daño físico o deterioro.

MATERIAL DE ESTUDIO

Definición de la Población Muestral

Diseño Estadístico
de Muestreo

Unidad de Análisis

- ✓ Placa Petri con el cultivo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 que cumpla con los criterios de inclusión.

MATERIAL DE ESTUDIO

Definición de la Población Muestral

Diseño Estadístico
de Muestreo

Unidad de Muestreo

- ✓ Placa Petri con el cultivo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 que cumpla con los criterios de inclusión.

MATERIAL DE ESTUDIO

Definición de la Población Muestral

Diseño Estadístico
de Muestreo

Marco de Muestreo

- ✓ No posee marco muestreo por ser un estudio no probabilístico por conveniencia.

MATERIAL DE ESTUDIO

Definición de la Población Muestral

Diseño Estadístico
de Muestreo

Tamaño Muestral: Comparación de medias

$$n = \frac{2 * (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

$$n = 2 * (1.96 + 0.842)^2 * 1^2$$

$$n = 16 \text{ placas}$$

n = Número de placas Petri por concentración.

$Z_{\alpha/2}$ = 1.960 Valor Z al 5% de error tipo I

Z_{β} = 0.842 Valor Z al 20% de error tipo II

σ Desviación estándar de los halos de inhibición con *Própolis* 10%.

$\mu_1 - \mu_2$ = Diferencia del halo de inhibición entre dos tipos *Própolis*.

Se asume: $\sigma / (\mu_1 - \mu_2) = 1$

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

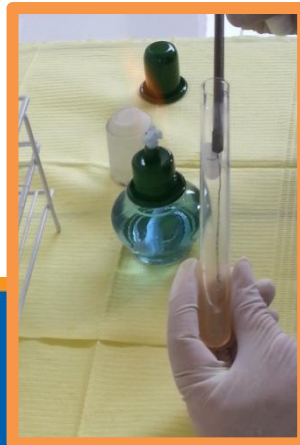
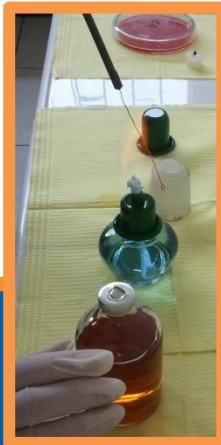
- a. Método: observación
- b. Descripción del procedimiento



PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Preparación de las Cepas Bacterianas



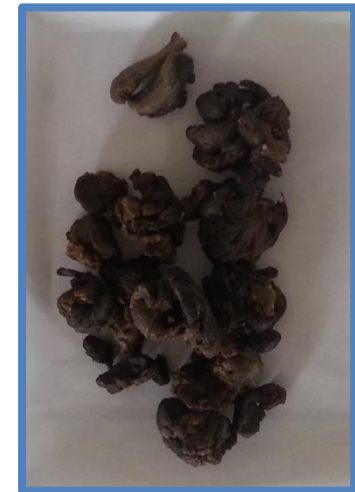
MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Obtención de las Muestras de *Própolis*



Región La Libertad
Chepen
(tipo A)

Región San Martín
Moyobamba
(tipo B)

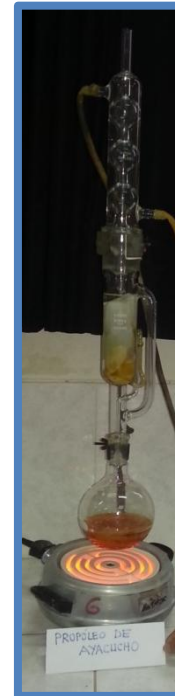


Región Ayacucho
Ayacucho
(tipo C)

PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

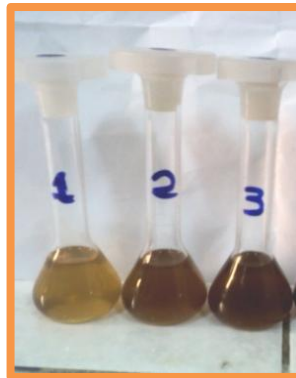
Preparación del Extracto Etanólico de *Própolis*



PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

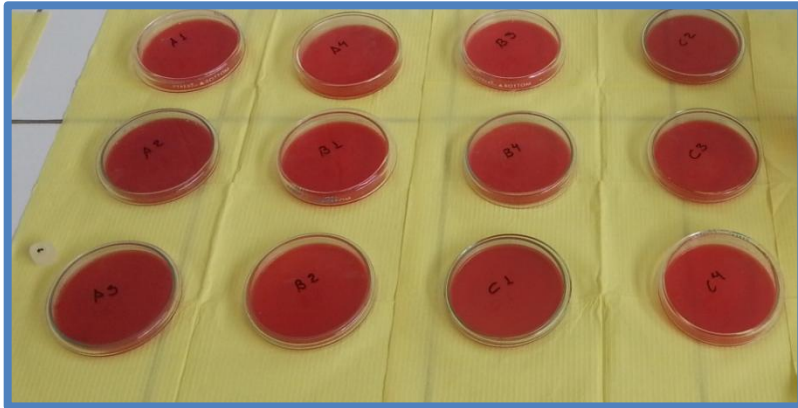
Preparación del Extracto Etanólico de *Própolis*



PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

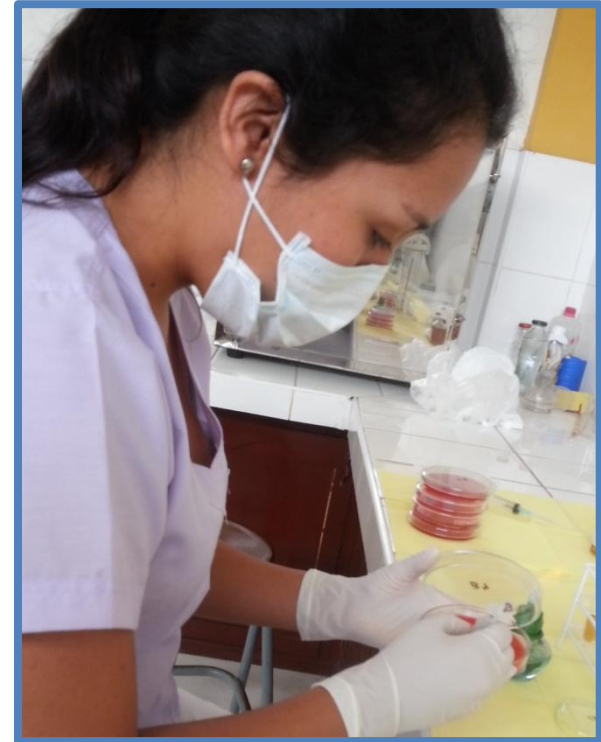
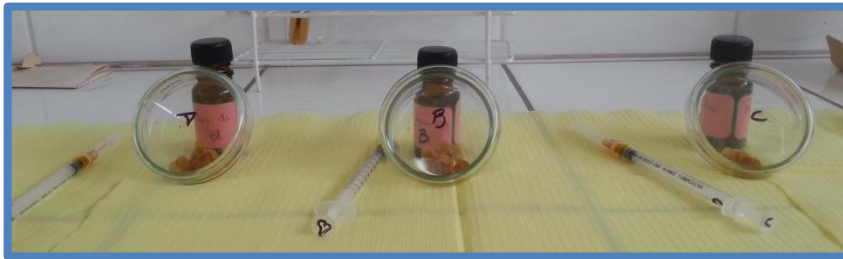
Incubación de las Placas



PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Aplicación del Extracto Etanólico



PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Incubación

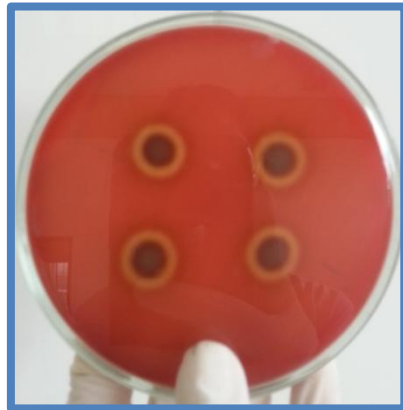
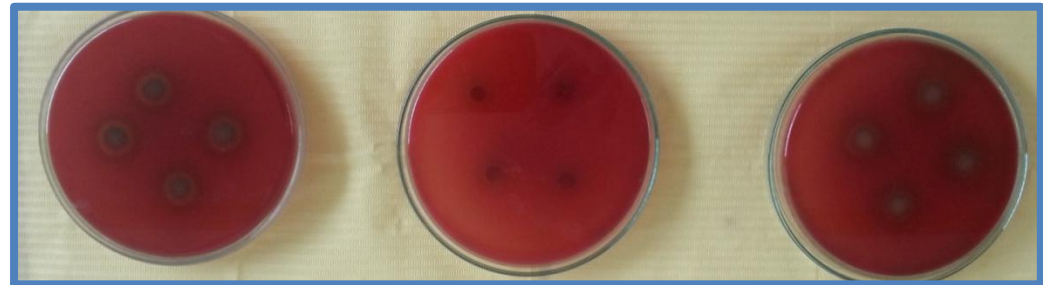


PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

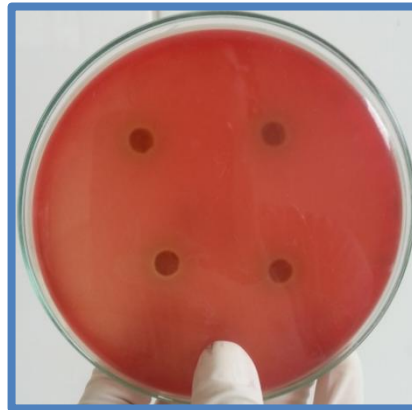
MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Lectura de las Placas

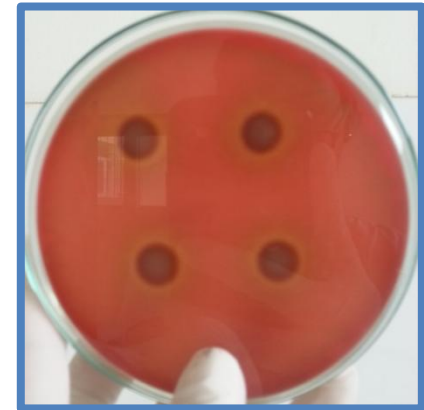
24 Hrs.



A



B



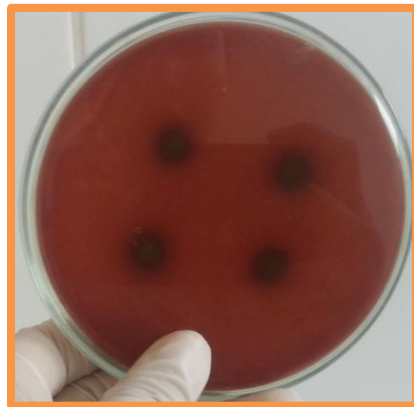
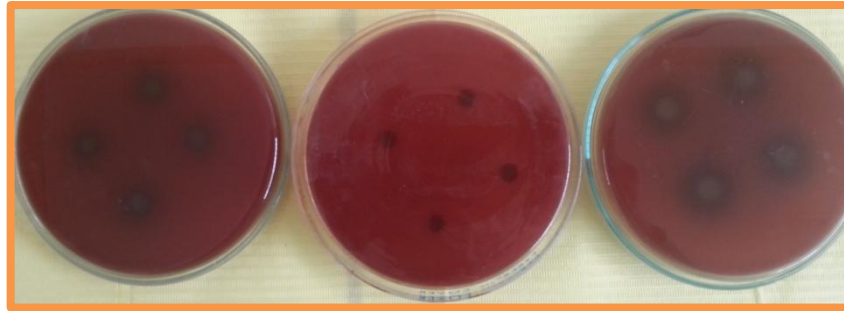
C

PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

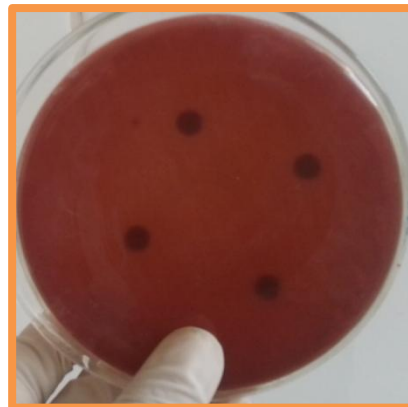
MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Lectura de las Placas

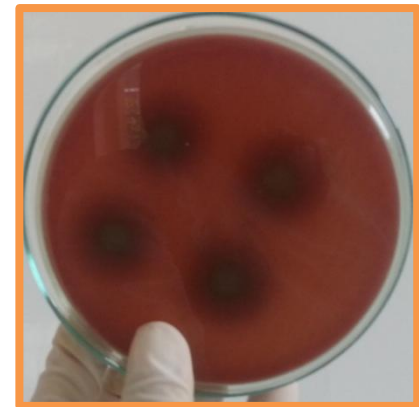
48 Hrs.



A



B

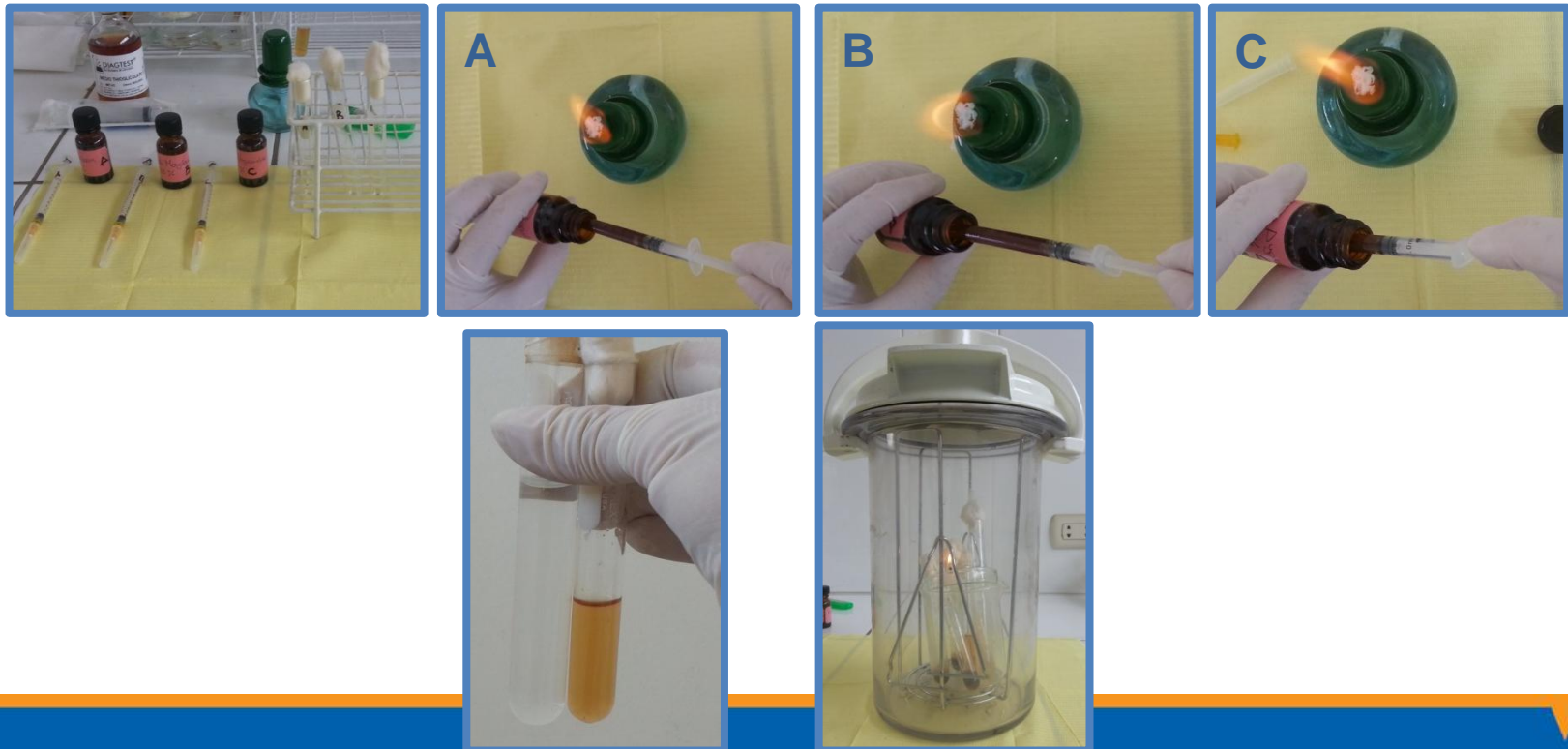


C

PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

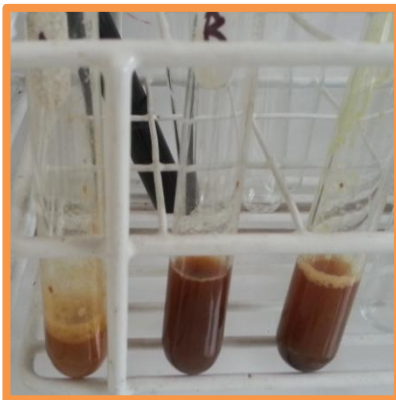
Determinación del Efecto Bactericida



PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

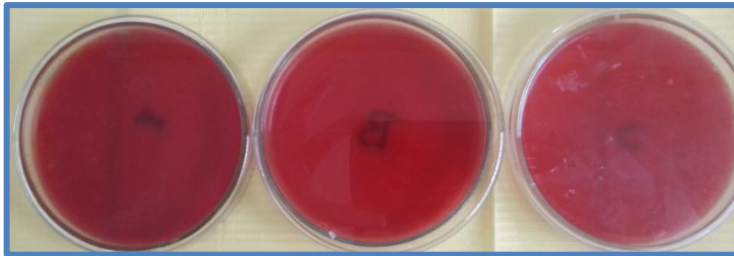
Determinación del Efecto Bactericida



PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Lectura de las Placas



A

B

C

PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

c. Instrumento de recolección de datos

| Nº PLACA | TIPO A (mm) | | TIPO B (mm) | | TIPO C (mm) | |
|----------|-------------|---------|-------------|---------|-------------|---------|
| | 24 Hrs. | 48 Hrs. | 24 Hrs. | 48 Hrs. | 24 Hrs. | 48 Hrs. |
| 01 | | | | | | |
| 02 | | | | | | |
| 03 | | | | | | |
| 04 | | | | | | |
| 05 | | | | | | |
| 06 | | | | | | |
| 07 | | | | | | |
| 08 | | | | | | |
| 09 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |
| 11 | | | | | | |
| 12 | | | | | | |
| 13 | | | | | | |
| 14 | | | | | | |
| 15 | | | | | | |
| 16 | | | | | | |

PLAN DE INVESTIGACIÓN
B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

c. Instrumento de recolección de datos

| N° PLACA | UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS | | |
|----------|---------------------------------|--------|--------|
| | TIPO A | TIPO B | TIPO C |
| 01 | | | |
| 02 | | | |
| 03 | | | |
| 04 | | | |
| 05 | | | |
| 06 | | | |
| 07 | | | |
| 08 | | | |
| 09 | | | |
| 10 | | | |
| 11 | | | |
| 12 | | | |
| 13 | | | |
| 14 | | | |
| 15 | | | |
| 16 | | | |

PLAN DE INVESTIGACIÓN

B. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

| VARIABLE | DEFINICION CONCEPTUAL | DIMENSIONES | DEFINICION OPERACIONAL E INDICADORES | TIPO | | ESCALA DE MEDICIÓN |
|--|--|---------------------------------------|--|---------------------|------------------|--------------------|
| | | | | SEGÚN SU NATURALEZA | SEGÚN SU FUNCION | |
| PRÓPOLIS | Compuesto gomo-resinoso, elaborado por las abejas, a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales. Cuyo principales componentes son los flavonoides los cuales poseen efecto antimicrobiano | ----- | Según el lugar de donde se obtuvo el <i>Própolis</i> : Tipo A 10% Tipo B 10% Tipo C 10% | Cualitativa | Independiente | Ordinal |
| EFFECTO ANTIMICROBIANO SOBRE EL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175 | Bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa bacteriana o biofilm dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. | Sensibilidad o resistencia bacteriana | Medición en milímetros del halo de inhibición. | Cuantitativa | Dependiente | Razón |
| | | Efecto bactericida | Se medirá a través del conteo unidades formadoras de colonias (UFC) | Cuantitativa | | Razón |
| TIEMPO | magnitud física con la que medimos la duración de acontecimientos de los sistemas sujetos a observación | ----- | 24 Horas 48 Horas | Cuantitativa | Independiente | Ordinal |

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA INFORMACIÓN

Información → Software IBM SPSS

Statistics 19 → tablas con medias y
desviación estándar.

- Prueba de Kruskal-Wallis
- Prueba de Mann-Whitney



RESULTADOS

TABLA 1

Comparar el efecto antimicrobiano *In Vitro* del *Própolis* tipo A, B y C frente a *Streptococcus mutan* ATCC 25175

| | Halo de inhibición (24 h) | | | Halo de inhibición (48 h) | | | UFC | | |
|-----------------|---------------------------|------|-------|---------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| | A | B | C | A | B | C | A | B | C |
| Media | 13,91 | 7,38 | 14,50 | 17,06 | 7,88 | 23,69 | 1,44 | 1,38 | 0,63 |
| DE | 0,80 | 0,50 | 1,58 | 1,91 | 0,62 | 1,54 | 1,93 | 1,93 | 1,26 |
| Mediana | 14,00 | 7,25 | 14,50 | 17,00 | 8,00 | 24,00 | 0,50 | 1,00 | 0,00 |
| Rango medio | 30,44 | 8,50 | 34,56 | 24,56 | 8,50 | 40,44 | 25,59 | 27,44 | 20,47 |
| Kruskall-Wallis | 32,604 | | | 42,164 | | | 2,505 | | |
| p | 0,000 | | | 0,000 | | | 0,286 | | |
| Mann-Whitney | b | a | b | b | a | c | a | a | a |

RESULTADOS

Tabla 2

Efecto antimicrobiano In Vitro del *Própolis* tipo A frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| | Halo de inhibición (mm) | | UFC |
|---------|-------------------------|-------|------|
| | 24 h | 48 h | |
| Media | 13,91 | 17,06 | 1,44 |
| DE | 0,80 | 1,91 | 1,93 |
| Mediana | 14,00 | 17,00 | 0,50 |

RESULTADOS

Tabla 3

Efecto antimicrobiano In Vitro del *Própolis* tipo B frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| | Halo de inhibición (mm) | | UFC |
|---------|-------------------------|------|------|
| | 24 h | 48 h | |
| Media | 7,38 | 7,88 | 1,38 |
| DE | 0,50 | 0,62 | 1,93 |
| Mediana | 7,25 | 8,00 | 1,00 |

RESULTADOS

Tabla 4

Efecto antimicrobiano In Vitro del *Própolis* tipo C frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| | Halo de inhibición (mm) | | UFC |
|---------|-------------------------|-------|------|
| | 24 h | 48 h | |
| Media | 14,50 | 23,69 | 0,63 |
| DE | 1,58 | 1,54 | 1,26 |
| Mediana | 14,50 | 24,00 | 0,00 |

DISCUSIÓN

Se determinó el efecto bactericida, mediante el método de dilución en tubos abreviados, usando el extracto etanólico de *Própolis* al 10%, obteniendo que los 3 tipos de *Própolis* presentan efecto bactericida. En un estudio similar realizado por Moreno Z. y cols (2007), Todas las muestras presentaron actividad antimicrobiana. Las muestras colombianas registraron un mejor efecto, seguido de los *Própolis* argentinos y finalmente los cubanos. De igual manera en este estudio se registró diferencia en la actividad.

En este estudio se obtuvo actividad antimicrobiana en todas las muestras, las cuales variaron de acuerdo al tipo de *Própolis*, dicha variación se puede atribuir a que las muestras fueron obtenidas de lugares con plantaciones distintas. En un estudio realizado por Leitão D. y cols (2004) se comparó el efecto antibacteriano del *Própolis* verde de Brasil y *Baccharis dracunculifolia*. Los dos agentes registraron mayor y similar actividad a una concentración de 4.0 mg/ml.

DISCUSIÓN

En contraste con el estudio realizado por Eguizába M. y col (2007) donde se encontró que la acción antibacteriana del extracto etanólico de *Própolis* peruano contra *Streptococcus mutans* fue significativa en las concentraciones de 0.8 y 20%. En el presente estudio, se utilizó una concentración del 10%, la cual fue efectiva para comprobar la acción antimicrobiana de los *Própolis* estudiados.

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la actividad antimicrobiana de los *Própolis* varía de acuerdo a la zona de recolección, lo cual nos hace suponer que su composición química no es la misma y/o las concentraciones de estas sustancias varían entre los *Própolis* estudiados. Righi A. y cols (2013), en su estudio nos demuestran que esto es posible, ya que compararon la composición química de 8 *Própolis* de Brazil, reportando diferencias de composición y concentración.

DISCUSIÓN

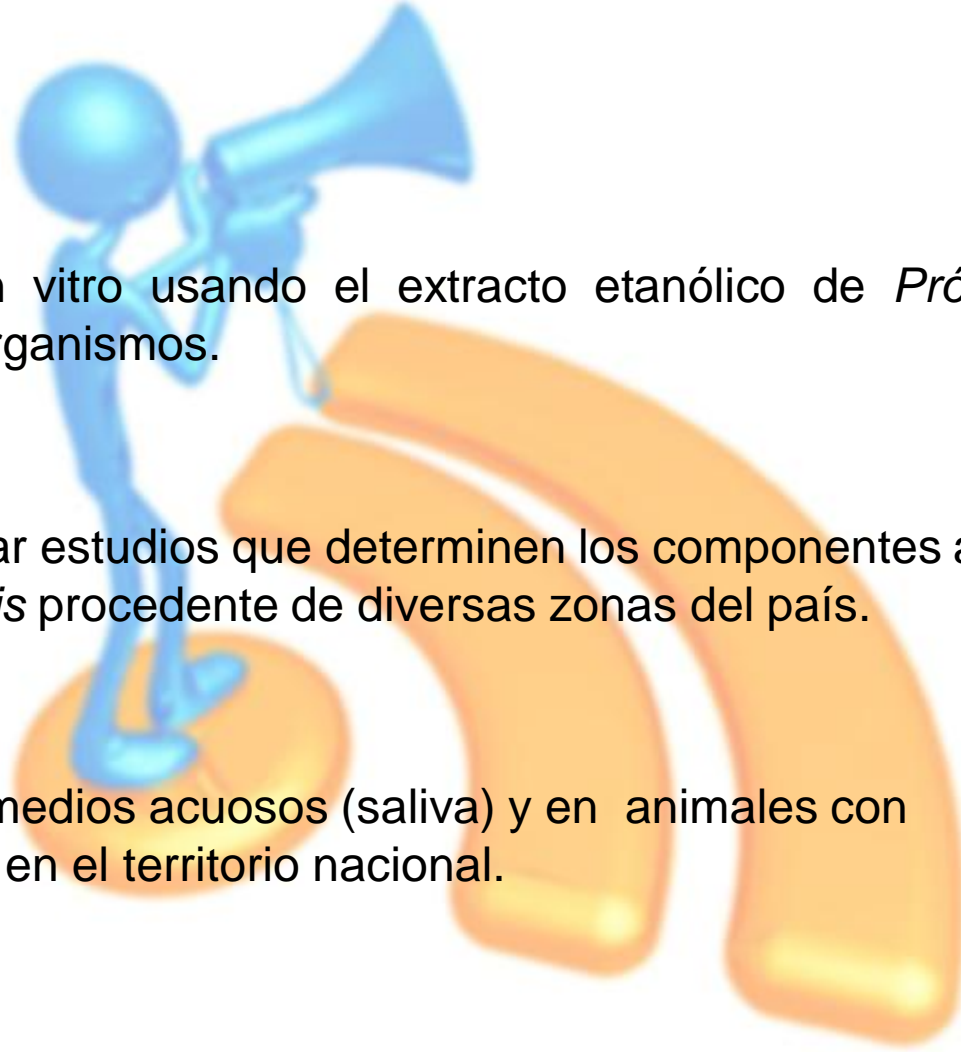
El comportamiento distinto de las variedades de *Própolis* fue demostrado a través de los resultados obtenidos en el presente estudio, al igual que en el estudio realizado por Elbaz G. y col (2012), donde se encontró que los valores de CIM del extracto etanólico de *Própolis* y las fracciones de hexano y cloroformo, en las pastillas de *Própolis* de Nueva Zelanda fueron similares para *Streptococcus mutans* y *Lactobacilli*, mientras que los valores de CIM para los *Própolis* egipcios fueron bajos con fracciones de hexanos tanto para *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*.

Se puede asegurar que a la concentración del 10% el extracto etanólico de *Própolis* ya presenta actividad antimicrobiana, actividad que se evidencia a las 24 horas e incrementa a las 48 horas, resultado que difiere de lo encontrado por Mayta F. y cols (2009) quienes obtuvieron la máxima actividad antimicrobiana a las 24 horas a concentraciones de 10 y 30%.

CONCLUSIONES

- ✓ El *Própolis* de Ayacucho posee mayor efecto antimicrobiando frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175
 - ✓ Los *Própolis* de Chepén, Moyobamba y Ayacucho poseen efecto antimicrobiando frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- ✓ A las 24 horas, el *Própolis* de Chepén y Ayacucho poseen mayor efecto antimicrobiano que el *Própolis* de Moyobamba frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
 - ✓ A las 48 horas, el *Própolis* de Ayacucho posee mayor efecto antimicrobiano, seguido del *Própolis* de Chepén y finalmente el *Própolis* de Moyobamba frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

RECOMENDACIONES



- ✓ Realizar estudios in vitro usando el extracto etanólico de *Própolis* frente a otros microorganismos.
- ✓ Realizar estudios que determinen los componentes activos de los *Própolis* procedente de diversas zonas del país.
- ✓ Realizar estudios en medios acuosos (saliva) y en animales con *Própolis* recolectados en el territorio nacional.



GRACIAS

La posibilidad de realizar un sueño es lo que hace que la vida sea interesante.