

# UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSTGRADO  
SECCIÓN DE POSTGRADO DE MEDICINA



**EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE *PROPOLIS DE APIS MELLÍFERA* (PROPÓLEO)  
FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATCC 29212.**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA**

**AUTORA:**

Br. MARÍA DEL PILAR ÁLVAREZ QUIROZ.

**ASESOR:**

Dr. WEYDER PORTOCARRERO REYES.

**CO ASESORES:**

Dra. ELVA MEJÍA DELGADO.

Dr. EDMUNDO ARTURO VENEGAS CASANOVA.

**Trujillo, diciembre del 2014**

## DEDICATORIA

**A nuestro Dios.** Quien con su infinito amor y bendición, protege y guía mi camino, para poder alcanzar todos los sueños y planes que él me ha trazado.

**A mis madres,** Rosita, María Esther y Gladys, por su gran dedicación, amor y consejos a lo largo de mi camino, con ello hicieron que cumpla una a una mis metas.

**A mi padrino Diarmuid Byrne,** por ser mi mejor amigo, quien brinda tanto amor, apoyo y comprensión hacia una hija que lo quiere y respeta como a un padre.

**A mis mayores tesoros Marito y Faty,** por ser los gigantes motivos para seguir adelante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Weyder Portocarrero Reyes, asesor de la presente investigación, por su valioso tiempo, apoyo y muy acertado asesoramiento en el desarrollo del mismo.

Al Dr. Segundo Leiva Gonzáles por su gran apoyo y colaboración en la realización de este trabajo de investigación.

A la Dra. Elva Mejía Delgado por su importante aporte y orientación en la ejecución de esta investigación.

Al Dr. Edmundo Venegas Casanova por su valiosa colaboración en la elaboración de esta investigación.

A todas las personas que me acompañaron en esta etapa de formación y contribuyeron en la ejecución del presente trabajo de investigación.

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como propósito determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Propolis de *Apis mellifera* “propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

El estudio se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo. La muestra estuvo constituida por 80 placas petri, teniendo 5 grupos de 16 placas, más un grupo control, conteniendo el medio Müller Hinton respectivamente con el extracto etanólico de *Propolis de Apis mellifera* “Propóleo” y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. El efecto antibacteriano se determinó a través de la concentración mínima bacteriana (CMB), y la susceptibilidad bacteriana.

El análisis estadístico se inició mediante la prueba de **SHAPIRO-WILK** para contrastar la normalidad, obteniendo resultado negativo, resolviendo realizar pruebas no paramétricas, utilizando la prueba de **KRUSKAL-WALLIS**, se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, para evaluar la comparación del crecimiento bacteriano y la susceptibilidad entre las distintas concentraciones del extracto. La prueba de Dunnett para compararlas con el control. La significancia estadística considerada fue de 5%.

Los resultados nos permiten concluir que el extracto etanólico de *Propolis de Apis mellifera* “Propóleo” posee efecto antibacteriano in vitro frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, siendo la diferencia estadísticamente significativa entre la concentración al 25% con 75% ( $p=0.024$ ) y 25% con 100% ( $p=0.025$ ), más no con la concentración al 50%. En la susceptibilidad bacteriana se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones al 25% con las otras tres concentraciones evaluadas, más no se observaron diferencias entre estas últimas.

Se recomienda realizar investigaciones, utilizando concentraciones menores a 25%, para así determinar una concentración mínima bactericida menor.

**Palabras Clave:** Efecto antibacteriano, Propolis, *Enterococcus faecalis*.

## ABSTRACT

The present investigation was to determine the antibacterial effects of the ethanol extract *Propolis apis mellifera* “propolis” against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

The study was conducted at the Laboratory of Microbiology at the National University of Trujillo. The sample consisted of 80 petri dishes, taking 5 groups of 16 plates, plus a control group, Müller Hinton medium containing respectively the ethanol extract *Propolis of apis mellifera* “propolis” and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. The antibacterial effect determined through a low bacterial concentration (WBC), and bacterial susceptibility.

Statistical analysis began by testing SHAPIRO-WILK for testing normality, obtaining negative results, resolving conduct nonparametric tests, using Kruskal-Wallis, we proceeded to the analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison test of Duncan, compared to assess bacterial growth and susceptibility between different concentrations of the extract. Dunnett's test for comparison with control. Statistical significance was 5% considered.

The results allow us to conclude that the ethanol extract of *Apis mellifera propolis* “propolis” possesses antibacterial effect in vitro against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, being a statistically significant difference between the concentration of 25% with 75% ( $p = 0.024$ ) and 25% to 100% ( $p = 0.025$ ), but not with the 50% concentration. In bacterial susceptibility statistically significant difference between the concentrations at 25% with the other three concentrations tested, but not differences were observed among the latter was found.

It is recommended to conduct research using concentrations less than 25%, to determine the minimum bactericidal concentration.

**Keywords:** Antibacterial Effect, Propolis, *Enterococcus faecalis*.

## INDICE

**DEDICATORIA**

**AGRADECIMIENTOS**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Problema .....	8
1.2 Hipótesis.....	8
1.3 Objetivos .....	8
<b>II. DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	9
2.1.1 Tipo de investigación .....	9
2.1.2 Área de estudio.....	9
2.1.3 Definición de la población muestral .....	9
2.1.3.1 Características generales .....	9
2.1.4 Diseño estadístico de muestreo .....	11
2.1.4.4 Método de selección .....	12
2.2 Descripción del procedimiento .....	13
2.3 Instrumento de recolección de datos .....	19
2.4 Variables .....	20
2.5 Análisis estadístico e interpretación de la información .....	21
<b>III. RESULTADOS</b> .....	22
<b>IV. DISCUSIÓN</b> .....	28
<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	33
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	34

**ANEXOS**



## I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años la medicina natural es una de las alternativas más utilizadas por la población rural, sobre todo en países en vías de desarrollo; aunque países industrializados también experimentan el renacimiento del interés por la investigación de esta alternativa médica. Siendo nuestro Perú un país afortunado por poseer una gran biodiversidad de recursos naturales; como el propóleo. Se presenta entonces como una interesante alternativa para investigar la posibilidad del manejo de algunas patologías orales.

La microbiota oral es extraordinariamente compleja. Se han llegado a aislar más de 200 especies distintas en una misma cavidad bucal en el transcurso del tiempo; de las cuales la mayoría tendría la característica de ser transitoria, de forma que sólo quedarían unas 20 especies aproximadamente.<sup>1</sup>

*El Enterococcus faecalis* es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, no esporulada, el tamaño celular oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros, se asocian en pares o cadenas cortas. Sus factores de virulencia no son muy bien conocidos y su hábitat natural es el tracto gastrointestinal humano. Puede ser aislado de la cavidad oral.<sup>1,2</sup>

La temperatura óptima de crecimiento in vitro de este microorganismo es de 35°C; no obstante, se ha observado su crecimiento entre 10°C y 45°C. El *E. faecalis* posee una pared celular con antígenos del grupo D, el cual es un ácido lipoteicoico que se encuentra asociado con la membrana citoplasmática de la



bacteria y que contiene residuos de glicerol. Además, posee gran cantidad de mureina y ácido teicoico.<sup>2, 3,4</sup>

Una característica notable de *E. faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias. Esta capacidad de resistencia, está relacionada con su capacidad de supervivencia en los conductos radiculares de dientes que han sido sometidos a tratamiento endodóntico, debido a que son capaces de suprimir la acción de los linfocitos. De allí que se afirme que el *E. faecalis* presenta una prevalencia de 24% a 77% en dientes mayormente asociados con el fracaso endodóntico.<sup>5, 6,7</sup>

El *E. faecalis* influye en la agregación y producción extracelular de superóxido y citolisinas tóxicas; capacidad para el intercambio de material genético que le permite penetrar en los conductos dentinarios. Al igual que la *Cándida albicans*, este microorganismo tiene gran variedad de factores de virulencia que le confieren la capacidad de sobrevivir incluso en la región periapical; es una bacteria que constituye un patógeno oportunista implicado en la presencia de la infección, influyendo en el pronóstico del tratamiento de conductos.<sup>8,9,10,11</sup>

La medicina natural y tradicional es un sistema emanado de los pueblos, y por lo mismo, bien aceptado como parte de sus culturas, que ha tenido un marcado auge en el ámbito mundial a partir de que la Organización Mundial para la Salud (OMS) llamó a introducir recursos medicinales tradicionales en los sistemas de salud en una convención celebrada en Ginebra el año 1977.<sup>12</sup>

La utilización de medicina natural tiene cada vez acogida, por la forma natural de curación y a la carencia de efectos secundarios de estas terapias; por tal motivo, se está investigando el uso de alternativas terapéuticas, las que incluyen sustancias químicas sintetizadas en laboratorios y productos que vienen de la naturaleza. Es así que, etnofarmacólogos, botánicos, microbiólogos y bioquímicos están trabajando en la investigación de sustancias fotoquímicas para desarrollar tratamientos contra enfermedades infecciosas, basados en productos naturales.<sup>13</sup>

El advenimiento de la apiterapia, disciplina médica que emplea los productos de las abejas para el tratamiento y la prevención de enfermedades tanto orgánicas, nutricionales e infecciosas; ha planteado la necesidad de estudiarlas en el marco de rigor científico, ocupando el Propóleo un lugar importante dentro de la Apiterapia.<sup>14</sup>

El propóleo es un producto natural, material fuertemente adhesivo, no tóxico, es un compuesto resinoso, de consistencia viscosa, elaborado a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales. La palabra propolis deriva del griego pro: para o en defensa, y polis: la ciudad, es decir, “defensa de la ciudad (o la colmena)”<sup>15</sup>

El propóleo es un producto de composición compleja. Es elaborado por insectos pertenecientes a la familia *Apidae*, principalmente la especie *Apis mellífera*, lo obtienen por adición de cera y secreciones salivales al material

resinoso, gomoso o balsámico que recolectan de yemas, brotes de diversas plantas. La producción anual del propóleo (10-300g/colmena); difiere en función a la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida.

16,17

En la colmena, las abejas utilizan al propóleo para diversos fines tales como; cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena evitando su descomposición, consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y evitar vibraciones <sup>18</sup>

Gracias a su contenido esencial, el propóleo suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido). El propóleo se recoge de las colmenas por medio de trampas o raspado, siendo el entrampado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación, la recolección se hace antes de la llegada del invierno. <sup>19</sup>

Al igual que la miel, el propóleo se conoce desde la más remota antigüedad y ha sido utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades, entre ellas en medicina. Con el posterior desarrollo de la farmacéutica y tratamientos fitoterápicos existe un resurgimiento en su uso. El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular. <sup>20</sup>

La composición química del Propóleo es bastante compleja, compuesta en un 50 – 55% de resinas y bálsamos (flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres), 30 – 40% de cera de abeja, 5 – 10% de aceites esenciales o volátiles, 5% de polen (Proteínas de Polen, aminoácidos libres) y 5% de materiales diversos (orgánicos y minerales) y depende básicamente de las fuentes vegetales donde se originaron. El grupo más importante de compuestos encontrado en propóleo son los denominados fenoles, los cuales, constituyen más del 50% del peso total (propiedades médicas del propóleo son atribuidas principalmente a la presencia de estas sustancias)<sup>21</sup>

Más aún, la literatura apunta a que algunas de las actividades pueden ser fuertemente relacionadas a los flavonoides (quercetina, apigenina, galangina, etc.), el principal compuesto fenólico del propóleo. Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Ellos regulan el crecimiento de las plantas e influyen sobre otras células biológicas de diversa manera.<sup>22</sup>

Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas, y además, destruyen algunos importantes protozoos. Poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, atrapadora de radicales libres, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. En este sentido se han realizado estudios, para determinar el efecto antibacteriano, antifúngico, etc.<sup>23,24,25,26,27</sup>

Farré<sup>15</sup> (2004), determinó que el propóleo presenta actividad antibacteriana frente a numerosos microorganismos tales como la *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus cricetus*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Bacteroides nodosus*, *Klebsiella pneumoniae*; e incluso sobre algunos resistentes a los antibióticos.

Soares<sup>22</sup> (2006), evaluó la actividad antimicrobiana in vitro de la tintura de propóleo, contra las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 2575), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609), *Streptococcus mitis* (ATCC9811), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10557) y *Lactobacillus casei* (ATCC 7469). El propóleo presentó una significativa actividad contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *S. mitis*, *Streptococcus sanguis*.

Muli<sup>28</sup> (2007), investigó la susceptibilidad de los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* frente a los extractos etanólicos de propóleos; llegando a la conclusión que las bacterias Gram positivas (*B. subtilis* y *Staphylococcus aureus*), son más susceptibles que las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *P. aeruginosa*) a propóleos.

Kim<sup>29</sup> (2011), realizó un estudio para determinar la concentración óptima de propóleos frente a aislados clínicos de *Streptococcus mutans*. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) y las curvas de tiempo-matan contra *Streptococcus mutans*. El resultado fue que el propóleo tenía un efecto bacteriostático en *Streptococcus mutans* y efecto bactericida sobre *Streptococcus sobrinus*. Concluyendo que el propóleo se puede utilizar en el desarrollo de productos de higiene oral.

El estudio de productos antibacterianos asequibles presentes en extractos de productos naturales como el *Propolis de apis mellífera* “Propóleo”, al alcance de la población peruana, puede jugar un papel fundamental en el tratamiento de infecciones que se producen en la cavidad bucal.

Por este motivo, al observar el efecto antibacteriano de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” frente a diversas bacterias y teniendo en cuenta la necesidad de seguir investigando sobre esta microbiota oral; se decidió realizar la presente investigación con el propósito de determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## **1.1 PROBLEMA:**

¿Posee efecto antibacteriano *in vitro* el extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212?

## **1.2 HIPÓTESIS:**

El extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” posee efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## **1.3 OBJETIVOS:**

### **1.3.1 Objetivo General.**

- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### **1.3.2 Objetivos Específicos.**

- Determinar la concentración mínima bactericida del extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” en diferentes concentraciones 25%, 50 %, 75% y 100% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,
- Determinar la susceptibilidad bacteriana del extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

## II. DISEÑO METODOLÓGICO

### 2.1 Material de estudio.

#### 2.1.1 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 fenómeno que se analiza
Prospectiva	Longitudinal	Comparativa	Experimental

#### 2.1.2 Área de estudio.

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana y de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, distrito de Trujillo, Departamento de La Libertad, Perú.

#### 2.1.3 Definición de la población muestral:

##### 2.1.3.1 Características Generales

Conjunto de placas petri en medio Müller Hinton del microorganismo de prueba: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la concentración de extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” correspondiente.



#### **2.1.3.1.1 Criterios de inclusión**

- Placa petri en medio Müller Hinton del microorganismo de prueba: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y la concentración de extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” correspondiente.

#### **2.1.3.1.2 Criterios de exclusión**

- Placa Petri con la macrodilución que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Placa petri con la macrodilución cuyo resultado en el proceso de incubación pueda ser dudoso.

#### **2.1.3.1.3 Criterios de eliminación**

- Placa Petri con la macrodilución que sufra deterioro, daño o rajadura durante la conservación y los procedimientos que no permitan su medición posterior.

## **2.1.4 Diseño estadístico de muestreo**

### **2.1.4.1 Unidad de análisis.**

#### **2.1.4.1.1 Para la Concentración Mínima Bactericida.**

Cada una de las placas petri en medio Müller Hinton de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y el extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” a la concentración correspondiente.

#### **2.1.4.1.2 Para la susceptibilidad bacteriana.**

Cada una de las placas petri en medio Müller Hinton de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y el extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” a la concentración correspondiente.

### **2.1.4.2 Unidad de muestreo**

#### **2.1.4.2.1 Para la Concentración Mínima Bactericida.**

Cada una de las placas petri en medio Müller Hinton de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y el extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” a la concentración correspondiente.

#### **2.1.4.2.2 Para la Susceptibilidad bacteriana.**

Cada una de las placas petri en medio Müller Hinton de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y el extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” a la concentración correspondiente.

### 2.1.4.3 Tamaño muestral.

Para determinar el tamaño muestral se empleó la fórmula que corresponde a comparación de medias, aplicado a la susceptibilidad bacteriana.

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

Dónde:

n = Número de placas Petri para cada concentración.

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

$Z_{\beta} = 0.842$  Valor Z al 20% de error tipo II

= Desviación estándar de la susceptibilidad bacteriana.

$\mu_1 - \mu_2$  = Diferencia a detectar en la susceptibilidad bacteriana entre dos concentraciones de extracto etanólico de propóleo.

Se asume:  $(\mu_1 - \mu_2) = 1^{31}$

Reemplazando se tiene:

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

$n = 16$  placas/grupo.

La muestra total estuvo constituida por 64 unidades de muestreo para los 4 grupos experimentales y 16 para el grupo control.

### 2.1.4.4 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.

## **2.2 Método, técnicas e instrumento de recolección de datos.**

### **2.2.1 Método:** Observación.

### **2.2.2 Descripción del Procedimiento**

#### **2.2.2.1 De la aprobación del proyecto:**

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación fue la obtención del permiso para la ejecución, mediante la aprobación del proyecto por el Comité Permanente de Investigación Científica de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego con la correspondiente Resolución Decanal.

#### **2.2.2.2 De la autorización para la ejecución:**

Una vez aprobado el proyecto se procedió a solicitar el permiso para poder trabajar en el Laboratorio de Microbiología y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.

La presente investigación fue desarrollada por la investigadora principal, bajo la supervisión de la Coasesora microbióloga.

#### **2.2.2.3 De la certificación del examinador.**

La investigadora se certificó con un Microbiólogo experto en el tema, para lo cual se realizó la lectura de 10 placas petri para el conteo de las UFC mediante la inspección visual de cada placa y también se repitió 10 veces la medición con un vernier los halos de inhibición en milímetros entre la investigadora y el experto.

#### **2.2.2.4 Obtención de la cepa:**

Este estudio utilizó un cultivo de la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, el cual se obtuvo del Laboratorio Genlab de los Estados Unidos de América con sede en Lima - Perú.

#### **I.2.2.5 Preparación del inóculo:**

Se hicieron diluciones de cada una de las cepas en caldo de tioglicolato estéril, hasta que se obtenga una turbidez semejante al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland (suspensión experimental) que corresponde a  $10^8$  bacterias / mL.

#### **I.2.2.6 Cultivo de la cepa:**

Las cepas estándar de *Enterococcus faecalis* fueron cultivadas en medio agar Müller Hinton e incubadas a 37 °C por 24 - 72 horas en microanaerobiosis (5 a 10% de CO<sub>2</sub>) en jarra Gaspak.

El cultivo de las cepas se realizó en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo, por la investigadora principal, bajo la supervisión de la coasesora Microbióloga.

#### **2.2.2.7 Obtención del extracto etanólico:**

##### **2.2.2.7.1 Recolección:**

El *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” se recolectó de las colmenas de Industrias Alimentarias del fundo Ayparumi, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias

de la Universidad Nacional Santiago Antúnez de Mayolo. Ubicado en el distrito de Marcará, provincia de Huaraz, perteneciente a la Región Ancash, Perú.

El propóleo se recolectó de las cantoneras para colmenas (cajas donde se haya preparado y acondicionado adecuadamente para la crianza de abejas); mediante una espátula, con la ayuda de un especialista con experiencia en la recolección de este recurso natural de un Centro de Apicultura. Se recolectó 200 gramos.

#### **2.2.2.7.2 Selección:**

Obtenida la muestra necesaria de propóleo se procedió a realizar la separación de algunos componentes que no forman parte de ella como polvo, restos de madera, de hojas, astillas de las colmenas o partes de abejas (trozos de alas, patas, aguijones, etc.); y otros, que puedan alterar su composición.

#### **2.2.2.7.3 Identificación:**

El propóleo seleccionado se identificó visualmente de acuerdo a sus caracteres organolépticos y asegurar su calidad y pureza. Con ayuda del Biólogo experto en el área.  
(Anexo N°1)

El transporte del propóleo desde el lugar de recolección hacia el laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo; se realizó en un frasco de vidrio estéril para evitar la contaminación del propóleo.

#### **2.2.2.7.4 Preparación del extracto etanólico de propóleo**

Para el procesamiento del EEP, el propóleo se extendió sobre una mesa y se seleccionó aquellos que no presenten impurezas, luego fueron cortados en trozos muy pequeños y posteriormente pulverizados en un mortero de porcelana y fue extraído con alcohol de 70°csp 100ml. Se prepararon cuatro extractos alcohólicos, al 25%, 50%, 75% y al 100% por maceración durante 8 días a 37°C en estufa; luego se filtró varias veces con papel filtro whatman número 40 y se obtuvo la solución etanólica del propóleo.

Después fue sometido a un rotavapor a 40°C para extraer el etanol. Luego se procedió a hacer las diluciones correspondientes, para obtener los extractos necesarios.

#### **2.2.2.8 De la Determinación de la Concentración Mínima Bactericida:**

Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) mediante la técnica de macrodilución en tubos, los cuales se dividieron en 4 grupos según la concentración del extracto etanólico de *Propilos de apis mellífera* “propóleo” al 25%, 50%, 75% y 100% y un control (tioglicolato) sin extracto etanólico.

En cada tubo había 0,9mL de cada concentración a los cuales se agregó 0.1mL de la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,

posteriormente se incubaron en microanaerobiosis por 24 horas en jarra Gaspak a 37°C.

Luego de 24 horas de incubación se determinó las UFC (cuentas viables), para lo cual, se sembró 0.1ml. de las soluciones de cada uno de los tubos procesados en placas petri con agar Müller Hinton, distribuyéndola en toda la superficie de la placa con ayuda de una asa de Driglasky, dichas placas fueron colocadas en la jarra Gaspak y llevados a una estufa por 24 hrs. A 37°C. en condiciones de microanaerobiosis, todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

Finalmente se procedió a la observación del crecimiento bacteriano mediante el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC), considerándose como la CMB a la menor concentración en la cual se observan UFC.

#### **2.2.2.9 De la determinación de la susceptibilidad antibacteriana.**

Se determinó mediante el método de Kirby y Bauer a través de la difusión de discos antibacterianos. Se prepararon discos de papel filtro estériles, los cuales se sumergieron dentro de las concentraciones experimentales y la solución control.

Se prepararon las placas petri con medio Agar Müller Hinton, sobre las cuales se sembró el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, la siembra se realizó por la técnica en camada utilizando hisopos estériles embebidos en los cultivos de la respectiva bacteria; se procedió al sembrado en camada en placas petri conteniendo Agar



Müller Hinton, se hisopeó uniformemente sobre toda la superficie del agar, girando cada placa 30 grados 10 veces aproximadamente. Previamente se prepararon discos de papel de filtro estériles de 6 mm de diámetro, los cuales fueron sumergidos dentro de las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% de extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” por un periodo de una hora, luego con una aguja estéril estos se colocaron sobre los cultivos de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 en las placas petri previamente preparadas; todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10cm de la llama de un mechero ; se realizaron 16 repeticiones para cada concentración experimental, se empleó como grupo control discos embebidos en penicilina, también 16 repeticiones. Las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 10 minutos.

Posteriormente, las placas se voltearon de posición y se incubaron en microanaerobiosis utilizando la jarra de GasPack, con el método de la vela, mediante el cual se obtiene un ambiente aproximadamente de 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, a una temperatura de 37° C durante 24 horas.

La lectura se llevó a cabo a las 24 horas mediante la inspección visual de cada placa. La medición se efectuó tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

### **2.3 Instrumento de recolección de datos:**

Para efectos de la investigación, la autora ha elaborado dos fichas (Anexo N°2) El instrumento contiene:

1. El conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)
2. Promedio de halos de inhibición expresada en milímetros (mm).

## 2.4 Variables:

Variables	Definición conceptual	Dimensiones		Definición operacional e Indicadores	Tipo de variable		Escala de medición
					Según su naturaleza	Según su función	
<b>Extracto etanólico de Propolis de <i>Apis mellifera</i> “Propóleo”</b>	Producto químico biosintetizado de Propóleo, que es una mezcla compleja de resinas creada por las abejas. Lo utilizaron desde épocas remotas, con diferentes fines. <sup>12,13</sup>	-----		<i>Se medirá según la designación de la concentración utilizada:</i>  25%, 50% 75% 100% <i>Control</i>	Cualitativa	Independiente	Ordinal
<b>Efecto antibacteriano frente a <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</b>	Capacidad de una sustancia química sintetizada parcial o totalmente en laboratorio que es capaz de inhibir el crecimiento y/o destruir el <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212. <sup>14</sup>	Concentración Mínima Bacteriana		Observación del crecimiento bacteriano (UFC)	Cuantitativa	Dependiente	De Razón
		Susceptibilidad bacteriana.		Medición de halos de inhibición expresada en (mm)	Cuantitativa		De Razón

## 2.5 Análisis estadístico de la información:

Se realizó la revisión de los datos obtenidos, con ellos se elaboró una base de datos EXCEL.

Los resultados se presentan mediante tablas y gráficos.

Se obtuvieron medidas estadísticas descriptivas: media y desviación estándar.

El análisis estadístico se inició mediante la prueba de **SHAPIRO-WILK** para contrastar la normalidad, obteniendo resultado negativo, resolviendo realizar pruebas no paramétricas, utilizando **KRUSKALL-WALLIS**, se procedió a realizar el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan, para evaluar la comparación del crecimiento bacteriano y la susceptibilidad entre las distintas concentraciones del extracto, más la prueba de Dunnett para compararlas con el control. Las pruebas fueron complementadas con las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y sus pruebas de comparaciones múltiples.

La significancia estadística será considerada al 5%.

Los análisis estadísticos se realizaron empleando el Software IBM SPSS Statistics, versión 19.

### III. RESULTADOS

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y estuvo constituido por una muestra de 80 placas petri para la determinación de la concentración mínima bactericida y la susceptibilidad bacteriana. Se encontraron los siguientes resultados:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto antibacteriano de las diversas concentraciones estudiadas en comparación al control tanto en la concentración mínima bactericida ( $p=0.000$ ) como en la susceptibilidad bacteriana ( $p=0.000$ ), siendo el control quien presentó mayor efecto antibacteriano (Tabla 1).

Las concentraciones mínimas bactericidas medias al 25%, 50%, 75% y 100% fueron 4.88, 2.94, 1.06 y 0.75 UFC respectivamente (Tabla 1). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones al 25% con 75% ( $p=0.024$ ) y 25% con 100% ( $p=0.025$ ), más no con la concentración al 50% (Gráfico 1).

Las susceptibilidades bacterianas medias al 25%, 50%, 75% y 100% fueron 8.56, 11.81, 11.63 y 12.63 mm respectivamente (Tabla 1). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones al 25% con las otras tres concentraciones evaluadas, más no se observaron diferencias entre estas últimas (Gráfico 2).

**Tabla 1:** Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Concentración	Concentración mínima bactericida			Susceptibilidad bacteriana		
	Media (UFC)	DE	valor de p	Media (mm)	DE	valor de p
25%	4.88 a	9.72		8.56 a	2.48	
50%	2.94 a	4.19		11.81 a	2.04	
75%	1.06 a	2.05	0.000	11.63 a	1.96	0.000
100%	0.75 a	1.06		12.63 a	2.55	
Control	2768.75 b	1147.59		30.00 b	0.73	

Prueba general: Kruskal-Wallis; DE: desviación estándar; a, b: letras diferentes

indican diferencias con el control (prueba: Duncan).

**Tabla 2:** Concentración mínima bactericida del extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” en diferentes concentraciones frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212,

Concentración	Concentración mínima bactericida		
	Media (UFC)	DE	valor de p
25%	4.88 a	9.72	0.000
50%	2.94 a	4.19	
75%	1.06 a	2.05	
100%	0.75 a	1.06	
Control	2768.75 b	1147.59	

Prueba general: Kruskal-Wallis; DE: desviación estándar; a, b: letras diferentes indican diferencias con el control (prueba: Duncan).

**Tabla 3:** Susceptibilidad bacteriana del extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

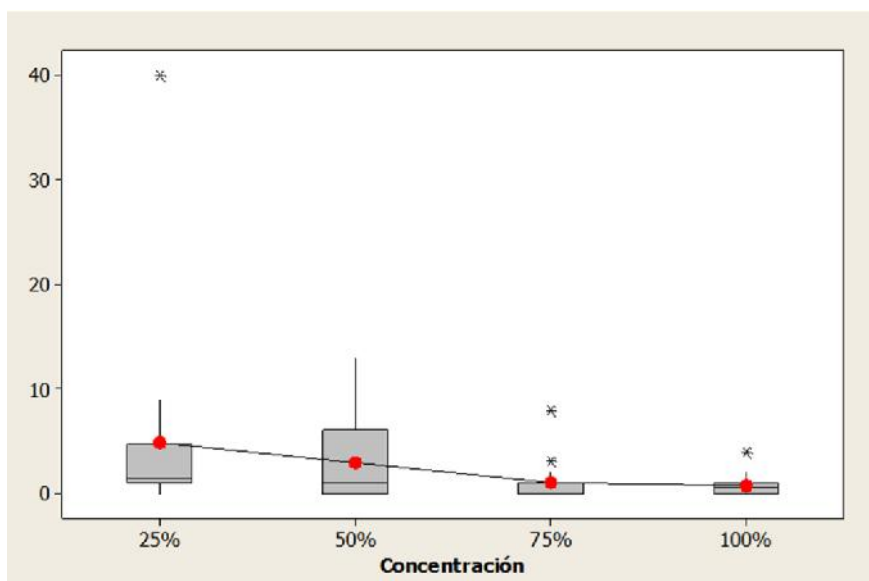
Concentración	Susceptibilidad bacteriana		
	<i>Media (mm)</i>	<i>DE</i>	<i>valor de p</i>
25%	8.56 a	2.48	0.000
50%	11.81 a	2.04	
75%	11.63 a	1.96	
100%	12.63 a	2.55	
Control	30.00 b	0.73	

Prueba general: Kruskal-Wallis; DE: desviación estándar; a,b: letras diferentes indican diferencias con el control (prueba: Duncan).



## Gráfico 1

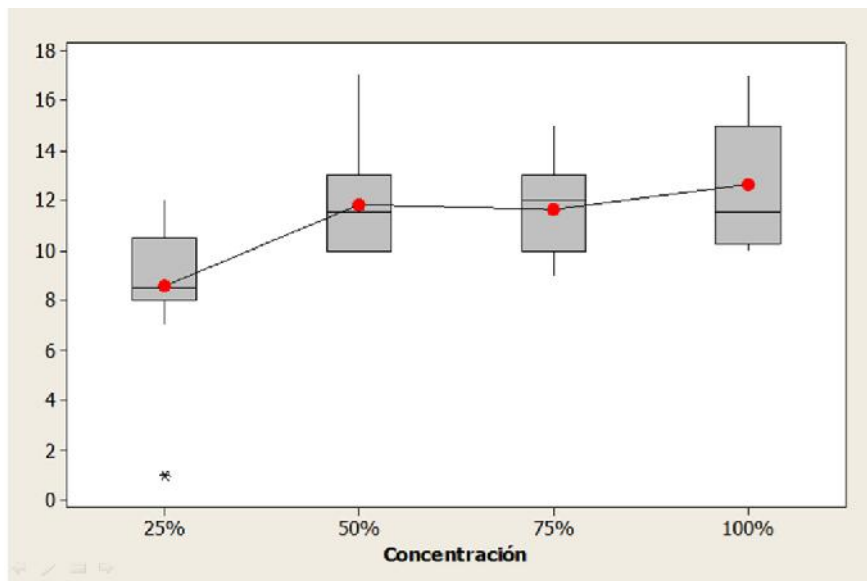
Concentración mínima bactericida\*\* del extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” en diferentes concentraciones 25%, 50 %, 75% y 100% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212



\*\*Diferencia entre las concentraciones 25% con 75% ( $p = 0.024$ ) y entre 25% con 100% ( $p = 0.025$ ). Prueba: Suma de rangos de Wilcoxon.

## Gráfico 2

Susceptibilidad bacteriana\*\* del extracto etanólico de *Propolis de apis mellifera* “Propóleo” en diferentes concentraciones 25%, 50 %, 75% y 100% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.



\*\*Diferencias entre las concentraciones 25% con 50% ( $p = 0.000$ ), 25% con 75% ( $p = 0.001$ ) y entre 25% con 100% ( $p = 0.000$ ). Prueba: Suma de rangos de Wilcoxon.

#### IV. DISCUSIÓN

El propósito de la presente investigación fue determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “propóleo” en diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y al 100% frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Hoy en día, los extractos naturales, etanólicos y aceites esenciales de diferentes sustancias de nuestros recursos naturales, son investigadas como posibles fuentes para generar nuevos componentes antibacterianos, frente a bacterias patógenas.

El *Propolis de apis mellífera* “propóleo”, es una resina cerosa de composición compleja y consistencia viscosa, producto del trabajo metabólico de las abejas. La sustancia inicial proviene de las exudaciones de los vegetales, que involucran resinas; esta sustancia es recolectada por las abejas y mezclada con cera, polen y saliva, para darle una consistencia más moldeable y así, usarlo como implemento estructural, de mecanismo de defensa y control biológico contra la proliferación de microorganismos en la colmena.<sup>30</sup>

Reyes<sup>31</sup> (2010), refiere que en nuestro país podemos encontrar diferentes tipos de propóleo de acuerdo a la ubicación geográfica de su producción, donde la altura de la zona de recolección y la escasa o nula contaminación de la región son características que le confieren un valor agregado al mismo.

Topcuoglu<sup>32</sup> (2012), reconoce que en la acción antibacteriana del propóleo intervienen bastante las mezclas de sustancias naturales se atribuyen principalmente a los flavonoides, los ácidos fenólicos, ácidos aromáticos y sus ésteres; con un mecanismo de acción probablemente se basa en la inhibición de la ARN-polimerasa bacteriana.

Algunos autores plantean la utilización del propóleo en la odontología como agente antibacteriano para el control de la placa bacteriana o en el tratamiento de diversas infecciones que se puedan presentar en la cavidad oral, ya que se ha comprobado su capacidad bactericida y bacteriostática frente a bacterias orales.

Reyes<sup>31</sup> (2010), evaluó si existe actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano ( EEPP) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica , teniendo como control positivo a la clorhexidina al 0.12% y como control negativo al alcohol al 96%, concluyendo que el extracto etanólico de Propóleo peruano presenta actividad antibacteriana *in vitro* sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, reportó que la actividad antibacteriana del propóleo peruano es mayor que la actividad antibacteriana de la clorhexidina 0,12 %.

Mayta<sup>21</sup> (2009), evaluó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú, determinaron *in vitro* su acción antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) frente a soluciones al 10% y 30% y compararlas con Clorhexidina al 0.12%, 0.05%, Listerine® y agua destilada. Donde se determinó que para el *Staphylococcus aureus*, el propóleo al

30% presentó mayor eficacia. Así mismo, se determinó que para el *Streptococcus mutans*, tanto el propóleo al 10% y 30% a las 24 y 48 horas no mostraron diferencia significativa.

Velázquez y Col <sup>33</sup> (2007), evaluaron la actividad de eliminación de antibacterianos y de radicales libres de propóleos sonorenses. Donde las muestras de propóleo tuvieron actividad antibacteriana frente a bacterias Gram – positivas únicamente. Se mostró una mayor actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (concentración inhibitoria mínima CIM- de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de una manera dependiente de la concentración. Además, propolis exhibió actividad de alto FRS ( $86\% \pm 3.0$  a  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) comparables con las de los antioxidantes vitamina C de referencia ( $87.4\% \pm 1.7$  a  $70 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) y BHT ( $66.07\% \pm 0.76$  a  $140 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). Concluyendo que los propóleos Sonorenses tuvieron una fuerte actividad antibacteriana contra *S. aureus*, además mostró actividad FRS potente comparables con los de la vitamina C y BHT.

Awawdeh<sup>34</sup> (2009), realizó un trabajo de investigación, evaluando la actividad antimicrobiana del propóleo frente a *Enterococcus faecalis*, utilizando el propóleo como un medicamento intracanal en 50 discos de dentina infectada con *E. faecalis*, de una longitud de 7mm obtenidos a partir de dientes humanos, comparando su eficacia antimicrobiana con la pasta de hidróxido de calcio como un medicamento intracanal a corto plazo de 1 a 2 días, demostrando que el propóleo en comparación con el Hidróxido de calcio tiene un efecto antibacteriano significativamente más alto después de la aplicación a corto plazo.

En nuestro estudio, el extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “propóleo” presentó efecto antibacteriano frente a la cepa de *Enterococcus faecalis*, resultado que concuerda a lo encontrado por Awawdeh<sup>34</sup>.

En este trabajo de investigación, se dejó de manifiesto la acción antibacteriana de este biocida natural, lográndose inhibir el crecimiento de la cepa de *Enterococcus faecalis*, permitiendo determinar la CMB y la susceptibilidad bacteriana, siendo el control quien presentó mayor efecto antibacteriano. Se encontró diferencia significativa en las susceptibilidad bacteriana entre las concentraciones al 25% con las otras tres concentraciones evaluadas, más no se observaron diferencias entre estas últimas, lo que se puede atribuir al método de dilución.

El propóleo como característica general, debemos señalar su solubilidad en el etanol, debido a su alto contenido resinoso. Como compuestos empleados para la extracción del mismo, pueden ser muy polares como el etanol y agua, teniendo en cuenta que este último presenta una desventaja de su alto punto de ebullición y presión a vapor que dificultan luego el ser removido rápida y completamente del extracto<sup>35</sup>.

En la presente investigación, la apiterapia va avanzando en la odontología, y al demostrar que el extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “propóleo” presenta efecto antibacteriano frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 constituye un peldaño más de la investigación en Odontología. El haber determinado la CMB podría servir a futuras investigaciones, para que se tenga en cuenta en la utilización de diferentes agentes de uso frecuente en el área de endodoncia e higiene bucal.

## V. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de Propolis de *apis mellífera* “Propóleo” presenta efecto antibacteriano in vitro frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

La concentración mínima bactericida del extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 es de 25%, obtenido mediante el sistema de placas petri.

La sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 es de 25%, obtenido mediante el sistema de placas petri.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda continuar con las investigaciones de productos antibacterianos presentes en productos de las abejas, incluyendo una mayor cantidad de pruebas in vitro, luego estudios con animales y de este modo promover la búsqueda de productos alternativos para combatir a diferentes bacterias, en nuestro campo profesional y más.
- Se recomienda realizar investigaciones, utilizando concentraciones menores a 25%, para así determinar una concentración mínima bactericida inferior a la que se encontró.
- Se recomienda realizar trabajos de investigación donde se estudie la posibilidad de extraer el propóleo sin utilizar alcohol.
- Se recomienda continuar con las investigaciones a nivel nacional, para poder determinar mediante ellas, cuáles son las especies propias del país que puedan tener mayor propiedad antibacteriana.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Liébana U. Microbiología Oral. 2da ed. Madrid: Interamericana; 2002.
2. Negroni M. Microbiología Estomatológica, Fundamentos y guía práctica. 2da ed. Buenos Aires, Ed.Médica. Panamericana; 2009
3. Juliet C. Estudio de susceptibilidad in vitro de *Enterococcus* spp. Rev Chil Infectol. 2002; 19 (2): 111 – 115.
4. Cohen S, Hargreave K. Vías de la pulpa. 9na ed. Madrid: Elsevier Mosby. 2009.
5. Preethee T, Kandaswamy D, Hannah R. Molecular identification of *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen EFAA in root canals of therapy-resistant infections of endodontic. J. Dent Conserv. 2012; 15(4): 329-322.
6. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. J Endod. 2010; 36(12):1950-5.
7. Arias M. Susceptibilidad de *Enterococcus faecalis* a soluciones irrigadoras de uso endodóntico. [Tesis]. Granada: Universidad de Granada. 2009.
8. Amorim L, Toledo O, Estrela C, Decurcio D, Estrela C. Antimicrobial Analysis of Different Root Canal Filling Pastes Used in Pediatric Dentistry by Two Experimental Methods. Braz Dent J. 2006; 17(4): 317-322.
9. Vidana R, Sullivan A, Billstrom H, Lund B. *Enterococcus faecalis* infection in root canals - host-derived or exogenous source? Lett. Appl. Microbiol. 2011; 52(2):109-15.
10. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci. 2003; 60:2622-36.
11. Koneman. Diagnóstico Microbiológico. 6<sup>ta</sup> ed. España Médica Panamericana. 2008.
12. Villatoro E, PIES Occidente. Promoción de la Medicina y Terapias Indígenas en la Atención Primaria de Salud: El caso de los Maya de Guatemala. Washington D.C; 2001.
13. Morales A. Iniciación a la apiterapia. Mérida: Venezolana. 2006.

14. Del Río P. Actividad Biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: Estudio in vitro [Tesis]. Santiago de Chile: Universidad de Chile; 2006.
15. Farre R, Frasquet I, Sánchez A. El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*.2004;45(1):21-43.
16. Sales S, Carvalho F, Marsicano J, Mattos M, Pereira J, Forim M, Silva M. Effect of propolis gel on the in vitro reduction of dentin permeability.*J.Appl. Oral Sci*.2011; 19 (4): 318 - 323.
17. 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.
18. Bertolini P, Biondi F, Pomilio A, Pinheir S, Carvalho M. Antimicrobial capacity of Aloe vera and propolis dentifrice against *Streptococcus mutans* strains in toothbrushes: an in vitro study. *J. Appl. Oral Sci*.2010; 20 (1): 32-37.
19. Mayta F, Sacsquispe S, Ceccarelli J, Alania J. Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. *RevEstomatolHered*.2012; 22 (1): 50 - 58.
20. Moromi H, Martinez E, Ramos D. Antibacterianos naturales orales: Estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. *Odontol. Sanmarquina*. 2009;12(1): 25 - 28.
21. 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 Hered*. 2010; 20(1):19-24.
22. Soares D, Olivera C, Brumond M, Padilha W. Susceptibilidad in vitro de bacterias bucais a tinturasfitotépápicas. *Rev. Odontol. Ciencia*. 2006; 21(53): 232 – 237.
23. Premoli G, Laguado P, Díaz Nathalie, Romero C, Villarreal J, González A. Revisión Bibliográfica Uso del Propóleo en Odontología. *Acta Odontol. Venez*. 2009; 48(2): 1 – 13.
24. Paviani L, Dariva C, Marcucci M, Cabral F. Supercritical carbon dioxide selectivity to fractionate phenolic compounds from the dry ethanolic extract of propolis. *Journal of FoodProcess Engineering*.2010; 33 (1):15–27.

25. Ortega N, Campo N, Cabezas F. Antibacterial Activity and cualitative composition propolis from two climatic regions cauca department. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011;9(1): 8-16
26. Victorino FR, Bramante CM, Zapata RO, et al. Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. *J Appl Oral Sci*. 2010; 18(6):621-624.
27. Drago L, De Vecchi E, Nicola L, Gismondo. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelatedpropolis). *J. Appl. Microb.*2007; (1): 1914–1921.
28. Muli E, Maingi J. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. *J VenomAnimToxins*. 2007; 13(3):655-663.
29. Kim MJ, Kim CS, Kim BH. Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean. *J Microbiol*. 2011; 49(1):161-4.
30. Muñoz L, Linares S, Narváez W. Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud*. 2011; 10(2): 101 – 111.
31. Reyes C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacienets con periodontitis crónica. [Tesis]. Lima - Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010.
32. Topcuoglu N, Ozan F, Ozyurt M, Kulekci G. In vitro antibacterial effects of glass – ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus mutans*. *Eur. J Dent*. 2012; 6(1): 428 - 433.
33. Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R. Astiazaran H, Hernandez J. Antibacterial and free- radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl. Microb.*2007 ;( 103): 1747–1756.
34. Awawdeh L, AL-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *J Aust. Endod*. 2009; (35): 52–58
35. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. 2da ed. Lima- Perú; 1994

# ANEXO



## ANEXO 2

### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Placas petri	Concentración Mínima Bactericida <i>Propolis de apis mellífera</i>				
	Control	25%	50%	75%	100%
01					
02					
03					
04					
05					
06					
07					
08					
09					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					

Placas Petri	Sensibilidad o resistencia bacteriana <i>Propolis de apis mellifera</i> (mm)				
	Control	25%	50%	75%	100%
01					
02					
03					
04					
05					
06					
07					
08					
09					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					

**ANEXO 3**  
**FOTOGRAFÍAS**



Fig 1. Colmenas de fundo Ayparumi – Facultad de Ciencias Agrarias de Universidad Santiago Antúnez de Mayolo – Huaraz - Perú



Fig 2. Recolectando el Propóleo





Fig 3 Propóleo recolectado



Fig 4 Cultivo de la cepa Enterococcus faecalis ATCC 29212



Fig. 5 Extractos etanólicos de propóleo.



Fig. 6. Siembra de la cepa de *Enterococcus faecalis*, mediante hisopado directo.



Fig. 7 Colocación de disco estéril, sumergido en extracto etanólico de propóleo en concentración correspondiente.



Fig 8. Colocación de las placas petri volteadas en la jarra de GasPack, incorporándole una vela encendida (método de la vela) para después llevarlo a la incubadora.



Fig 9. A las 24 horas de haber realizado la siembra se procedió a hacer las lecturas y el llenado de la ficha de recolección, tomando en cuenta: la identificación de la muestra, concentración y medida en milímetros del halo de inhibición formado.

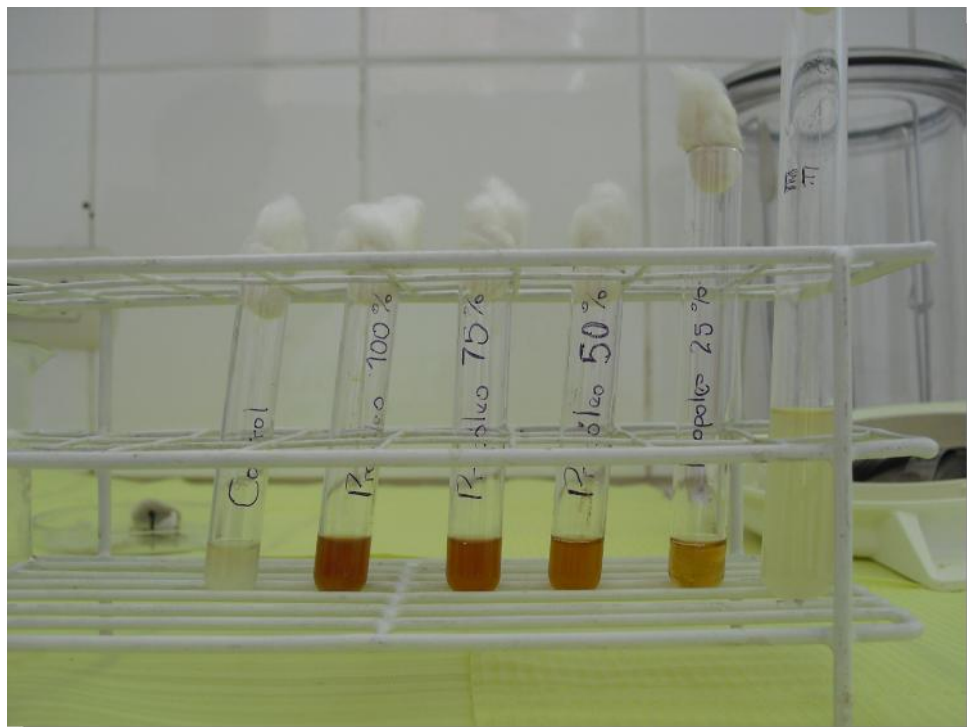


Fig 10 Tubos de ensayo con 0.9ml de cada concentración , más 0.1ml de la cepa. *Enterococcus faecalis* ATCC29212.

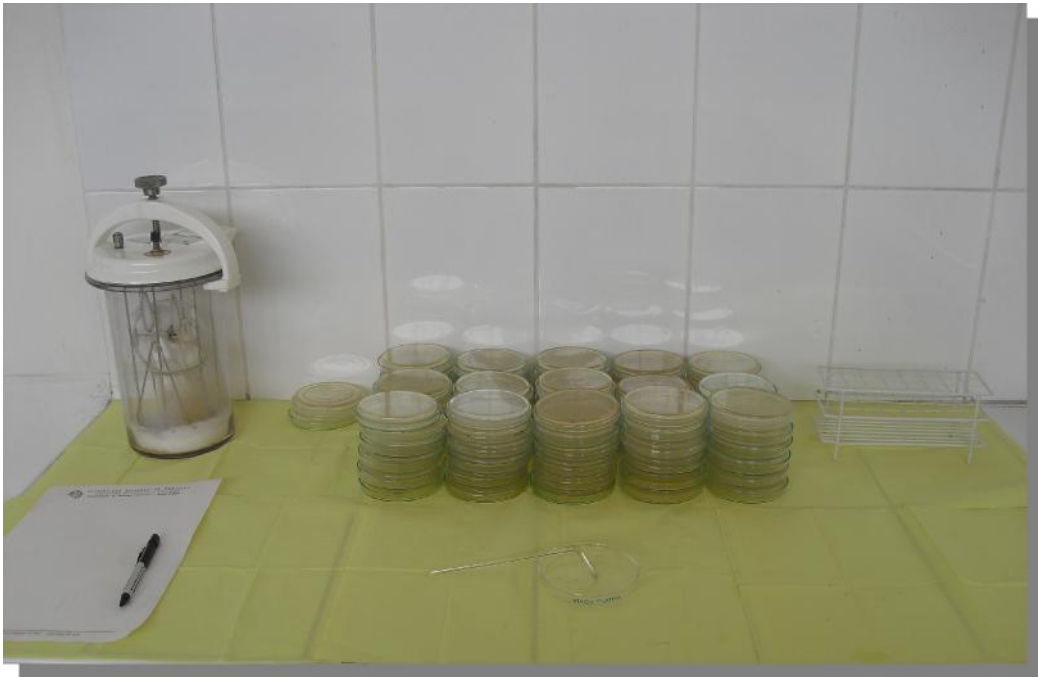


Fig. 11 Tubos de ensayo luego de incubación en jarra GasPack , más placas petri con agar Muller Hinton.



Fig 12. Sembrado de 0.1mL de soluciones de cada uno de los tubos de ensayo procesados, en placas petri distribuyendola en toda la superficie de la placa con asa de Driglasky.

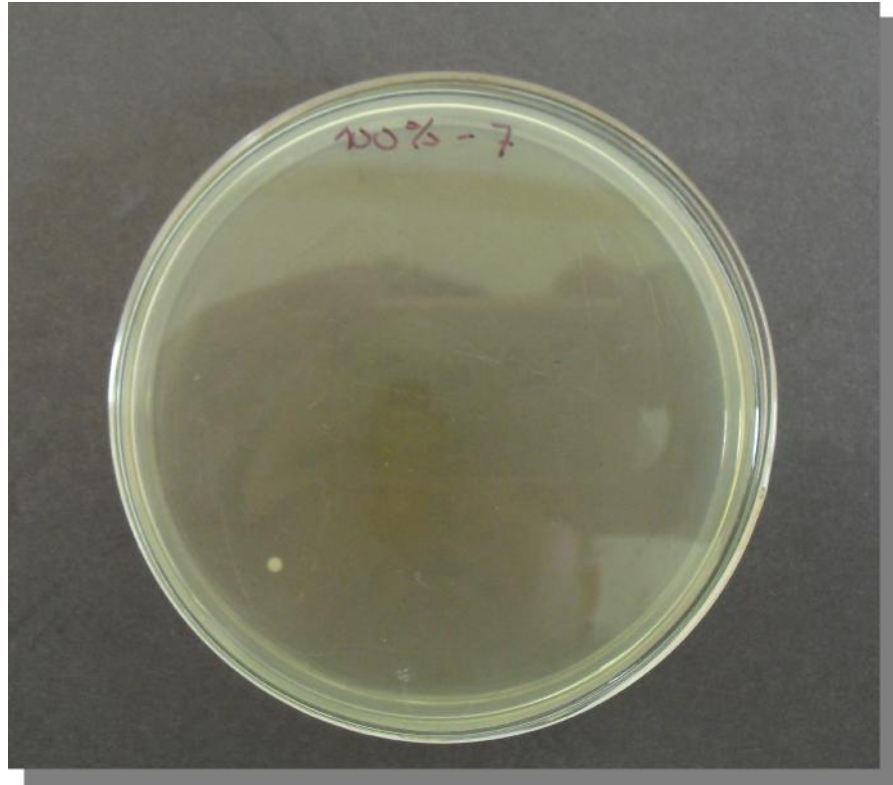


Fig. 13 A las 24 horas de haber realizado la siembra se procedió a realizar el conteo de UFC y el llenado de la ficha de recolección, tomando en cuenta: la identificación de la muestra, concentración.