

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE FARMACIA  
Y BIOQUÍMICA**



**Actividad antibacteriana de un enjuague bucal  
formulado a base de extracto etanólico de propóleo  
de *Apis mellifera* "abeja". Ayacucho, 2012.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

**PRESENTADO POR:  
Bach. CÁRDENAS PAREDES, INGRID MARIBEL**

**AYACUCHO - PERÚ  
2013**

## Acta de Sustentación de Tesis

R.D.N° 058-13-UNSCH-FCB-D

Bachiller: Ingrid Maribel Cárdenas Paredes

En la ciudad de Ayacucho a los 30 días del mes de mayo de 2013, se reunieron, en el auditorium de la Facultad de Ciencias Biológicas, siendo las cuatro y dos de la tarde, los miembros del jurado evaluador presidido por el Dr. Segundo Tomás Castro Carranza e integrada por los siguientes docentes: Mg. Victor L. Cárdenas López, Mg. Maricela López Sierralta, Mg. Edgar Cárdenas Landeo (Miembro-Asesor), actuando como secretario docente el Prof. José Alarcón Guerrero para recepcionar la sustentación de la tesis de título: Actividad antibacteriana de un enjuague bucal formulado a base de extracto etanólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja". Ayacucho, 2012. Presentado por la bachiller Ingrid Maribel Cárdenas Paredes, quien pretende optar el título profesional de Químico Farmacéutica.

Como primer acto el presidente dio las recomendaciones a la sustentante para su exposición la que no debe exceder de 45 minutos, la misma que utilizó un tiempo de 35 minutos.

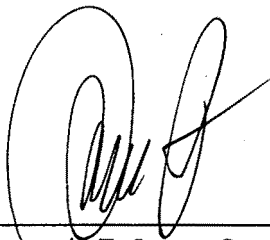
Acto seguido el presidente pidió la participación de los miembros del jurado en el siguiente orden: Mg. José Alarcón, Mg. Maricela López, Mg. Victor Cárdenas, Mg. Edgar Cárdenas. Culminada esta fase el presidente ordenó a la sustentante y público en general abandonar temporalmente el auditorium para que los miembros del jurado puedan deliberar sus calificaciones. De la deliberación se obtuvo las siguientes calificaciones:

Miembro Jurado	Exposición	Rpta. a preguntas	Promedio
Mg. José Alarcón Guerrero	18	17	18
Mg. Maricela López Sierralta	18	18	18
Mg. Victor Cárdenas López	17	18	17
Mg. Edgar Cárdenas Landeo	18	18	18

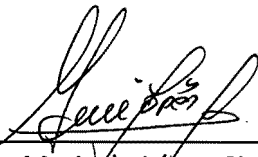
Promedio: 18

Al finalizar la evaluación por los miembros del jurado la sustentante Bachiller Ingrid Maribel Cárdenas Paredes a través de su trabajo de tesis obtuvo la calificación promedio de 18 de la cual dan fe los miembros del jurado estampando su firma al pie de la presente.

Se concluyo el acto de sustentación de tesis siendo las siete y treinta de la noche.



Dr. Segundo T. Castro Carranza  
Miembro- Presidente



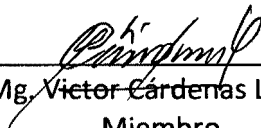
Mg. Maricela López Sierralta  
Miembro



Mg. Edgar Cárdenas Landeo  
Miembro- Asesor



Mg. José Alarcón Guerrero  
Miembro- Secretario Docente



Mg. Víctor Cárdenas López  
Miembro

## **DEDICATORIA**

A Dios, a la memoria de mi padre, a mi madre, a mis hermanos y amigos.



## AGRADECIMIENTO

A mi *alma mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por brindarme los conocimientos necesarios para el desarrollo de mi vida profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica.

Al mi asesor el Mg. Q.F. Edgar Cárdenas Landeo por sus conocimientos, su apoyo y orientación.

A la Biga. Eliana Benedetti Gerente del Laboratorio Microbiol S.A., por su apoyo y paciencia.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Bases teóricas	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Ubicación de la investigación	18
3.2. Tipo de investigación	18
3.3. Población y muestra	18
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	19
3.5. Recolección de datos	23
3.6. Análisis de datos	24
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	42
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	49

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 01. Composición del propóleo	12
Tabla 02. Distribución de los enjuagues bucales por cada placa inoculada con cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	23
Tabla 03. Características organolépticas y especificaciones del propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja".	26
Tabla 04. Características organolépticas de cuatro enjuagues bucales de propóleo.	27
Tabla 05. Presencia de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	28
Tabla 06. Análisis estadístico de los diámetros de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	29
Tabla 07. ANVA y prueba de Tukey de los diámetro de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	30
Tabla 08. Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	33
Tabla 09. ANVA y prueba de Tukey del porcentaje de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 01. Estructura química de un flavonoide.	14
Figura 02. Variación de los halos de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	31
Figura 03. Tendencia del diámetro promedio del halo de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	32
Figura 04. Porcentaje de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	35
Figura 05. Tendencia del porcentaje de inhibición promedio según concentración de enjuagues bucales frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	36

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 01. Obtención del extracto de propóleo.	50
Anexo 02. Elaboración de los enjuagues bucales.	51
Anexo 03. Sembrado de las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> por incorporación.	52
Anexo 04. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 0,5% con su respectivo control y blanco	53
Anexo 05. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 1% con su respectivo control y blanco.	54
Anexo 06. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 2% con su respectivo control y blanco.	55
Anexo 07. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 4% con su respectivo control y blanco.	56
Anexo 08. Informe del ensayo microbiológico de un enjuague bucal elaborado a base de extracto etanólico de propóleo al 0,5%.	57
Anexo 09. Informe del ensayo microbiológico de un enjuague bucal elaborado a base de extracto etanólico de propóleo 1%.	58
Anexo 10. Informe del ensayo microbiológico de un enjuague bucal elaborado a base de extracto etanólico de propóleo 2%.	59
Anexo 11. Informe del ensayo microbiológico de un enjuague bucal elaborado a base de extracto etanólico de propóleo 4%.	60
Anexo 12. Métodos de extracción USP 35.	61
Anexo 13. Pruebas microbiológicas USP 35..	64
Anexo 14. Medios y soluciones según USP 35.	69
Anexo 15. Excipientes según concentración de enjuagues bucales.	71
Anexo 16. Diámetro de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	72
Anexo 17. Porcentaje de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	73

Anexo 18. Prueba de Kolgomorov Smirnov del diámetro de los halos de inhibición frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	74
Anexo 19. Estadísticos descriptivos para el tamaño de los halos de inhibición según concentración sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> .	75
Anexo 20. Análisis de varianza para el tamaño de los halos de inhibición de los enjuagues bucales según control y blanco sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	76
Anexo 21. Análisis de varianza para el tamaño de los halos de inhibición de los enjuagues bucales según control y blanco sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	77
Anexo 22. Estadísticos descriptivos para el porcentaje de inhibición de los enjuagues bucales según control y blanco sobre de <i>Streptococcus mutans</i> .	78
Anexo 23. Análisis de varianza para el porcentaje inhibición de los enjuagues bucales según control y blanco sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	79
Anexo 24. Test de Tukey para el porcentaje de inhibición de los enjuagues bucales según control y blanco sobre <i>Streptococcus mutans</i> .	80
Anexo 25. Matriz de consistencia.	81

## RESUMEN

Las caries dentales son un problema de alta incidencia a nivel mundial relacionada con la existencia de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral; es así que el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo (EBEE) de *Apis mellifera* "abeja" de la provincia de Huanta; utilizando el método de incorporación con cilindros calibrados, enfrentado los EBEEP al 0,5%, 1%, 2% y 4%, a cepas de *S. mutans* ATCC 25175, comparándose con un control (clorhexidina 0,12%) y un blanco (enjuague bucal sin principio activo), mediante la medición de los halos de inhibición. El estudio se enmarcó dentro de un diseño de investigación aplicada experimental, el análisis estadístico se realizó mediante las pruebas de ANVA y Tukey (SPSS 20). La investigación fue desarrollada en los Laboratorios de Farmacia y Bioquímica de la UNSCH y el Laboratorio Microbiol S.A. Se determinó que la actividad antibacteriana del EBEEP contra *Streptococcus mutans* muestra una tendencia directamente proporcional a la concentración 0,5%, 1%, 2% y 4%, en el diámetro de los halos formados; presentando mayor eficacia el EBEEP al 4% con una media de  $21,53 \text{ mm} \pm 0,48 \text{ mm}$  y se encontró que las cuatro concentraciones luego de las 48 horas no presentan una diferencia significativa con las concentraciones adyacentes ( $P > 0,05$ ), sin embargo todas presentan una diferencia significativa frente al control (enjuague con clorhexidina) y al blanco ( $P < 0,05$ ). Por otro lado se determinó que el EBEEP al 4% presentó un mayor porcentaje de inhibición con una media  $96,40 \pm 1,19$ ; siendo este valor significativamente diferente a las otras concentraciones pero similar al obtenido con el control ( $P < 0,05$ ). Llegando a concluir que el EBEEP al 4% tuvo mayor efecto antibacteriano frente a las otras concentraciones; no llegando a superar a los efectos del control pero si obteniendo similares resultados al determinar su porcentaje de inhibición.

Palabras clave: Propóleo, *Streptococcus mutans*, Actividad antibacteriana.

## I. INTRODUCCIÓN

La incidencia de las enfermedades infecciosas y su consecuente costo en vidas y recursos económicos en las últimas décadas ha hecho que su prevención sea una de las principales preocupaciones de las entidades encargadas de atención en salud a nivel mundial; en lo que concierne a la salud oral, la prevalencia de caries son de particular importancia, presentándose mayor tendencia de la enfermedad en los países en vías de desarrollo, colocando al Perú entre los países latinoamericanos con mayores niveles de caries dental.<sup>1,2</sup> La cavidad oral alberga innumerables microorganismos en un ecosistema de complejidad considerable, constituyendo la flora bucal del ser humano como altamente diversa. Estos microorganismos son parte importante en la salud y las enfermedades orales; por lo tanto es de vital importancia buscar formas farmacéuticas que contengan nuevas sustancias para ayudar a controlar la proliferación de estos agentes patógenos.<sup>1</sup>

Debido al uso indiscriminado y prolongado de antimicrobianos artificiales se ha elevado el número de patógenos mutantes resistentes, tomando fuerza el uso de antimicrobianos naturales como una alternativa eficaz y económica en el tratamiento de infecciones bacterianas, siendo los apifármacos como el propóleo ejemplo fehaciente de esto.<sup>3</sup> Sin embargo, muchas indicaciones del propóleo se apoyan en resultados empíricos que necesitan ser comprobados científicamente



mediante nuevas observaciones y estudios clínicos sistematizados.<sup>4</sup> La medicina natural y tradicional es un sistema emanado de los pueblos y por consiguiente, bien aceptado como parte de su cultura, actualmente tiene 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.<sup>3</sup> Además, en la actualidad se reconoce la importancia de los compuestos de origen natural porque poseen innumerables características, son de bajo costo y sus principios activos están biológicamente equilibrados evitando que se acumulen en el organismo, no presentando efectos secundarios o colaterales.<sup>5</sup> En estos últimos años, se ha puesto especial atención a las indicaciones médicas del propóleo por poseer diferentes propiedades atribuidas a la gran variedad de compuestos químicos que posee, su composición no es estable y varía según la procedencia.<sup>6</sup> Así mismo, destaca entre sus propiedades a la actividad antibacteriana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides.<sup>7</sup> Cabe mencionar que el Perú tiene una gran biodiversidad en flora, la cual favorece el desarrollo de apicultura especialmente en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, esto reforzado con el desarrollo de la farmacéutica y tratamientos fitoterápicos, ha permitido considerar a los enjuagues bucales como una alternativa de tratamiento por ser una formulación líquida muy útil, por que actúan como un medio ideal para la medicación de la cavidad oral.<sup>8</sup> En el presente estudio se investigó la actividad antibacteriana de unos enjuagues bucales elaborados a base de extracto etanólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja", de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, enfrentado a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, un microorganismo de la cavidad oral.

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal formulado a base de extracto etanólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja".

### **Objetivos específicos**

- Evaluar las características de los enjuagues bucales elaborados con extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones.
- Determinar y comparar la actividad antibacteriana de los enjuagues bucales elaborados sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar y comparar el porcentaje de inhibición de los enjuagues bucales elaborados sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar la concentración de enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo que tiene similar actividad antibacteriana que el enjuague bucal con clorhexidina al 0,12% (control) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

En el trabajo de investigación titulado: desarrollo y efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Streptococcus mutans*, se elaboró un gel dental a base de extracto de propóleo y se evaluó la acción antimicrobiana en cepas estandarizadas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, concluyendo que el gel dental elaborado a base de propóleo, tiene calidad farmacéutica y que tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.<sup>9</sup>

En un estudio de antibacterianos naturales, elaborando con tres diluciones de extracto de propóleo al 0,8%; 20% y 30%, aplicado sobre bacterias *Streptococcus mutans*, se encontró un efecto antibacteriano inversamente proporcional a la concentración de la dilución, resultando la dilución 0,8% como la más efectiva, así como sus halos mayores respecto a los de la clorhexidina 0,12%.<sup>10</sup>

En la investigación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del propóleo peruano proveniente del valle de Oxapampa, usando cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*; Mayta y Sacsquispe<sup>7</sup> demostraron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo al 10% y 30%, comparándolos con dos testigos la clorhexidina 0,12% y el listerine 0,05%

usando como blanco el agua destilada; de tal modo que se llegó a concluir que el extracto etanólico de propóleo (EEP) al 30% no tiene una diferencia significativa con el EEP al 10% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y que la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo al 30% contra el *Streptococcus mutans* fue superior frente al listerine 0,05% pero menor ante la clorhexidina 0,12%.

En el estudio de la actividad antimicrobiana de cinco muestras de propóleo recogido en diversas regiones en Turquía y del Brasil, Koru *et al.*<sup>11</sup> se preparó extractos etanólicos de propóleos enfrentados contra nueve cepas anaerobias; concluyendo que los propóleos son más eficaces contra bacterias anaerobias Gram positivas que Gram negativos.

Equizabal y Moromi<sup>12</sup> determinaron la acción antibacteriana del extracto etanólico del propóleo peruano (EPPP) proveniente del Valle de Oxapampa (Pasco); mediante el método de difusión en placas usando cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Lactobacillus casei* ATCC 393, enfrentándolas al EPPP a 0,8, 20 y 30% v/v, y comparándolos con testigos clorhexidina 0,12% y alcohol 70%. Encontraron como resultado que la acción antibacteriana del EPPP contra *Streptococcus mutans* muestra una tendencia de su actividad inversamente proporcional a su concentración, siendo la acción antibacteriana mayor a una concentración de 0,8 y 20%; concluyen que el indicado EPPP en solución al 8% tiene una mejor acción antibacteriana contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* que la clorhexidina al 0,12%.

Estudios realizados por Bruschi *et al.*<sup>13</sup> demostraron la actividad antimicrobiana de micropartículas de gelatina que contienen propóleo frente a patógenos de orales (*Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus anguinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Candida*

*albicans*, y *Lactobacillus casei*) demostrando que las micropartículas muestran actividad contra todas las cepas ensayadas, mostrando una mayor actividad contra las cepas de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* y *Candida albicans*.

Dantas *et al.*<sup>14</sup> evaluaron de manera clínica la actividad anti-séptica de una solución a base de propóleo, determinando CMI en medio de cultivo sólidos, usando cepas de *Streptococcus mutans* a partir del cual fue elaborada una solución de propóleo al 6,25% la que fue comparada con un control positivo de clorhexidina al 0,12%; el estudio se realizó en 15 niños con caries, demostrando que la solución de propóleo presenta actividad antimicrobiana en comparación a la clorhexidina pudiendo ser usado como agente terapéutico.

Un estudio sobre las propiedades antibacterianas del propóleo cubano, frente a cepas bacterianas: *Straptococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Escharichia coli* y *Klebsiella spp*, concluye que la actividad antibacteriana varía según su origen fitogeográfico.<sup>15</sup>

Un estudio del efecto del propóleo sobre diferentes microorganismos patógenos orales, entre los cuales incluyó *Straptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus pyogenas* y *Candida albicans*, demostró la susceptibilidad de los mismos al propóleo. Sus resultado mostraron inhibición en el crecimiento de todos ellos, excepto de *Porphyromonas gingivalis*.<sup>16</sup>

En una investigación en 50 escolares con antecedentes de alta infección por *Streptococcus mutans*, verificaron la actividad anticaries de una crema dental que contiene 0,8 g de extracto de propóleo blando, demostrando la reducción significativa en el índice de caries y el porcentaje de afectados en un 72,7 y 85,6% respectivamente.<sup>17</sup>

Existen estudios del efecto antibacteriano de la solución hidroalcohólica de propóleo al 4% frente a cepas de microorganismos de la cavidad oral, midiendo su eficacia ante diferentes soluciones como el alcohol al 70%, cloranfenicol sódico al 10% y agua como controles positivo y negativo; revelándose la sensibilidad de los *Streptococcus* a la solución hidroalcohólica de propóleo en un 62%.<sup>18</sup>

Un estudio comparativo sobre el efecto antibacteriano del extracto de propóleo al 0,37%, usado sobre bacterias orales comunes entre ellas el *Streptococcus mutans*, demostró que el propóleo tiene un efecto antibacteriano considerable observado luego de las 24 horas, 72 horas y 7 días de exposición, llegando a obtenerse halos con diámetros mayores a 13 mm, hasta en un 65,6% de las placas.<sup>19</sup>

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Antibacterianos naturales**

Simultáneamente al desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, se ha desplegado un gran interés de parte de los investigadores por estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas con efecto antimicrobiano.<sup>20</sup>

Se debe destacar que los fármacos a base de derivados de productos naturales presentan una inmensa ventaja respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos siempre están biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse biológicamente entre sí, de forma que en general no se acumulen en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados.<sup>21</sup>

La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de derivados de plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. En el ámbito farmacéutico, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación, con el fin de descubrir y avalar la actividad antimicrobiana de distintos derivados de las plantas y productos naturales.<sup>22</sup>

### **2.2.2. Agentes antibacterianos**

Los antibacterianos son compuestos químicos capaces de inhibir el crecimiento e incluso destruir especies bacterianas, de forma específica y a bajas concentraciones sin toxicidad (o muy baja para el organismo humano).<sup>23</sup>

Los antibióticos son considerados los principales agentes antibacterianos debido a que estos son originados del metabolismo de algunos microorganismos. En la práctica, el término antibiótico ha adquirido uso como sinónimo de agente antibacteriano en general, natural o sintético.<sup>24</sup> Actualmente se conocen más de 5000 antibióticos de los cuales alrededor del 60,0% son producidos por el género *Streptomyces*, de los cuales más del 90,0% son utilizados en terapia humana.<sup>25</sup>

### **2.2.3. Caries dental**

Según la OMS, la caries dental es un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y que evoluciona hasta la formación de una cavidad. Si no se atiende oportunamente, afecta la salud general y la calidad de vida de los individuos de todas las edades.<sup>26</sup>

Es de origen multifactorial, porque se reconocen factores tanto intrínsecos como extrínsecos, entre los primeros se menciona el estado anatómico y funcional de los tejidos de la cavidad oral, calidad y cantidad de saliva, y el sistema inmunológico; entre los segundos la condición socioeconómica y cultural, hábitos

y conductas de higiene bucal, elevado consumo de azúcares fermentables en alimentos y bebidas, disponibilidad de sustratos requeridos por microorganismos específicos, etc. Posteriormente, se ha agregado otro factor: el tiempo, que contribuye en el desarrollo de caries asociado e manera simultánea a los otros factores.<sup>27</sup>

Esta enfermedad es producto de una serie de cambios que ocurren por el desequilibrio iónico en el proceso de desmineralización y remineralización de los tejidos duros del diente, dicho desequilibrio resulta del metabolismo de los carbohidratos por parte de las bacterias presentes en la biopelícula de placa dental supragingival. Este proceso, en consecuencia puede provocar la pérdida de minerales con la posterior formación de una cavidad si no se interviene a tiempo, pues dicha pérdida de sustancia dentaria representa una etapa tardía de un proceso patológico que ha progresado durante meses o años.<sup>28</sup>

#### **2.2.4. *Streptococcus mutans***

Es el principal agente etiológico de caries dental, esta es una especie bacteriana perteneciente al grupo estreptococos, constituyen el grupo más predominante de la cavidad oral, (20 a 30% de la flora cultivable) estando ampliamente distribuida en la población mundial. Es una bacteria cococaea, Gram positiva, microaerofílica, que para poder crecer y desarrollarse "*in vitro*" necesita de medios enriquecidos y un ambiente con baja tensión de oxígeno, sus células se disponen en cadenas.<sup>29</sup>

Tiene como primer hábitat la superficie dentaria humana, aunque también puede ser identificada en fauces, posee diversos factores de virulencia para causar la caries dental, y son: acidogenicidad, lo cual significa que puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo, originando una disminución en pH y la desmineralización



del esmalte dental. Posee aciduricidad, ya que tiene la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo. También posee acidofilicidad, porque puede resistir la acidez del medio en el que se encuentra. Como otros factores para producir la caries éste microorganismo sintetiza glucanos y fructanos por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), produciendo los polisacáridos glucano y fructano, a partir de la sacarosa.<sup>28</sup>

La síntesis de polisacáridos intracelulares y su capacidad de metabolizarlos son factores de virulencia ya que proporcionan a la célula un sustrato de donde obtener la energía y mantener la producción de ácido durante largos periodos de tiempo. Además producen dextranasas y fructanasas, enzimas capaces de metabolizar los polisacáridos extracelulares, sobre todo los glucanos solubles, favoreciendo la producción de ácido y constituyendo un sustrato en los periodos en que disminuye el aporte exógeno. A partir del metabolismo de la sacarosa, estos microorganismos producen principalmente ácido láctico, fundamental en la virulencia, ya que aparentemente este ácido es el más potente que interviene en la desmineralización del diente.<sup>30</sup>

### **2.2.5. Propóleo**

El propóleo es un compuesto resinoso y pegajoso, elaborado por la abeja *Apis mellifera*, a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales. La palabra propóleo deriva del griego pro, para o en defensa, y polis, la ciudad, es decir, "defensa de la ciudad (colmena)", se postula que diferentes propóleos pueden presentar diferentes propiedades químicas y farmacológicas, por lo tanto, la estandarización de los propóleos es una necesidad.<sup>31</sup>

El propóleo es un producto de composición compleja. Las abejas *Apis mellifera* lo obtienen por adición de cera y secreciones salivales al material resinoso gomoso o balsámico que recolectan de yemas, brotes y heridas de diversas plantas.<sup>22</sup>

En la colmena las abejas utilizan al propóleo con 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>22</sup>

Dentro de los productos apícolas, el propóleo se destaca por sus variables propiedades biológicas, lo que ha permitido que en los últimos años se haya incrementado su utilización en fitomedicina y en veterinaria, es por lo tanto una materia prima valiosa para la industria.

#### **2.2.5.1. Origen**

En relación a la procedencia del propóleo elaborado por las abejas. Una teoría dice que es recolectado por las abejas de más de 15 días que, con sus mandíbulas toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de las diferentes plantas, después de sujetar la partícula resinosa, la abeja mueve hacia atrás la cabeza hasta que logra desprenderla, almacenándola con sus patas en los cestitos del polen. Las enzimas de su boca participan también en la operación para evitar su adherencia. Cuando llega a la colmena con la carga otras obreras le ayudan a descargar el propóleo, misión que llega a durar varias horas. Si el material no es bastante maleable, la abeja recolectora se instala en la piquera, donde espera que el sol ablande la carga y pueda desprenderse mejor de ella. Otra teoría sobre el origen del propóleo manifiesta que se trata de un producto resultante de la digestión del polen y que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el biche y el intestino medio.<sup>32</sup>

La composición del propóleo es sumamente compleja, cada región presenta condiciones de flora diversa dependiente de fenómenos locales, influenciados por la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa y

brillo solar.<sup>6</sup>

### 2.2.5.2. Composición del propóleo

El propóleo posee diferencia en su composición y esta se debe principalmente a la flora del área ecológica, los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas que condicionan en las concentraciones de las mismas, microorganismos presentes en el entorno geográfico, factores climatológicos, influyendo también las características macroscópicas y organolépticas del propóleo y la técnica de obtención; sin embargo existen sustancias que se encuentran en el propóleo de modo constante y relativamente estable.<sup>33</sup>

Tabla 01. Composición del propóleo

Elementos	Porcentaje
Resinas y bálsamos	50-55%
Cera	30-40%
Aceites volátiles aromáticos	5-10%
Polen	5%
Sustancias orgánicas y minerales	5%

Fuente: Gómez *et al.*<sup>33</sup>

Las abejas elaboran el propóleo de acuerdo a sus necesidades y probabilidades de fuentes de materia prima, siendo imposible poder encontrar dos colmenas que produzcan propóleos idénticos, aun cuando estén ubicados en la misma zona geográfica. Incluso los propóleos de las distintas partes de la colmena no tendrán exactamente la misma composición. La variabilidad en la composición no es por la diversidad de elementos que presentan lo cual es básicamente estable, sino por las cantidades de cada uno de estos componentes presentes en el propóleo.<sup>32</sup>

De manera general y de acuerdo a diversos estudios se ha determinado que los componentes principales del propóleo son las ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen (además de impurezas), siendo la proporción de cada componente variable según la época de recolección, el origen vegetal de la resina, así como también de la raza de las abejas que lo produce.<sup>34</sup>

### **2.2.5.3. Composición química**

Estudios preliminares realizados por varios investigadores señalan que se han encontrado mayor porcentaje de compuestos fenólicos en el propóleo que recubre los panales que en el destinado a reducir el ingreso de agentes extraños a la colmena. Se ha identificado en el propóleo más de 160 compuestos, 50% de ellos fenólicos a los que se les atribuye acción farmacológica.<sup>6</sup>

Revisiones sobre la composición química de propóleo dan cuenta de los siguientes grupos químicos: aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, amino ácido y ésteres aromáticos, chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares.<sup>35</sup>

El grupo más importante de compuestos encontrados en el propóleo son los denominados fenoles, los cuales constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propóleo son atribuidas principalmente a la presencia de estas sustancias. Más aún, la literatura apunta que algunas de las actividades pueden ser fuertemente relacionadas a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo.<sup>36</sup>

Los flavonoides son pigmentos vegetales sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, que generalmente exhibe brillantes colores como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son expuestos a luz UV. Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies

bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas, además destruyen algunos importantes protozoos. Poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, atrapadora de radicales libres, antimutagénico y moduladora de la actividad enzimática.<sup>19</sup>

Desde el punto de vista químico, los flavonoides son compuestos orgánicos de bajo peso molecular, cuya estructura básica posee 15 carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ) compuesta por dos anillos bencénicos (A y B), el organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos.<sup>37</sup>

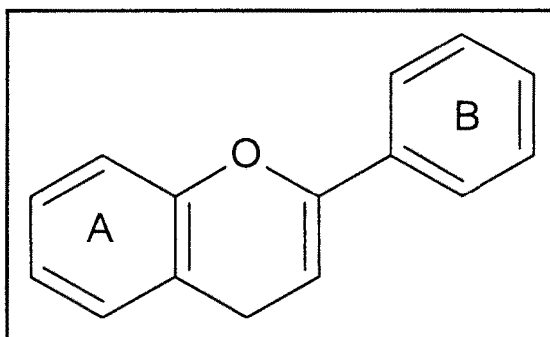


Figura 01. Estructura química de un flavonoide.<sup>33</sup>

Los flavonoides y ácidos fenólicos, junto con sus esteres se consideran los principales compuestos bioactivos del propóleo; se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal en las plantas superiores que poseen en las partes aéreas, en capullos y hojas jóvenes especialmente en aquellas con sistema vascular.<sup>37</sup>

#### **2.2.5.4. Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción antimicrobiano del propóleo es complejo y no está completamente entendido. La actividad en contra de los microorganismos está más relacionada al efecto sinérgico de los flavonoides (y otros fenoles), que a la acción de cada uno de ellos por separado.<sup>38</sup>

Así mismo, otros autores han determinado que el propóleo es capaz de inhibir *in vitro* la enzima glucosiltransferasa. Esta enzima es producida por el *Streptococcus mutans* y constituye un factor de virulencia asociado con caries dental. Glucosiltransferasa cataliza la formación de glucanos solubles e insolubles a partir de sacarosa, y contribuye significativamente a la formación de la matriz de polisacáridos de la placa dental.<sup>39</sup>

Otros autores como Takaisi-kikuni y Schilcher observaron que la acción antibacteriana utilizaba varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, desorganización del citoplasma, la membrana plasmática y la pared celular, produciendo bacteriólisis parcial e inhibición de la síntesis de proteínas. Además observó una inhibición de la división celular en presencia de propóleo, y este hecho sugirió que el propóleo podría actuar inhibiendo la replicación del ADN a través de la RNA polimerasa, indirectamente, afectando la división celular.<sup>40</sup>

#### **2.2.5.5. Efectos adversos**

Las reacciones adversas a la aplicación local de propóleo son escasas y se refieren generalmente a reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo dermatitis de contacto. La dermatitis generalmente se da en zonas palmares y dedos, correspondiente a la manipulación de partes de la colmena que contienen propóleo, o bien se han visto reacciones alérgicas en la mucosa oral, mucositis

orales agudas con ulceraciones, debido a la ingesta o aplicación de propóleo.<sup>41</sup>

### **2.2.6. Enjuague bucal**

Son formulaciones líquidas para la profilaxis de la cavidad oral esencialmente actúan como medio ideal para la medicación de la boca, encías o dientes, asimismo, sirven como medio de limpieza del aliento y la superficie dental. Los enjuagues bucales ayudan a suprimir temporalmente el mal aliento, reducen las bacterias en la boca y la refrescan, dejando en ella un sabor agradable. Algunos contienen ingredientes activos para ayudar a proteger contra enfermedades orales como la caries o la gingivitis.<sup>42</sup>

Otra de las propiedades que se resaltan en estos productos es el combatir a los gérmenes causantes del mal aliento, el cual es producido por la descomposición bacteriana de restos de alimentos entre los dientes, la saliva, o de células, generando sustancias volátiles.

Los enjuagues bucales pueden ser clasificados en tres grupos: enjuagues antibacterianos, aquellos que combaten la desproporcionada carga bacteriana de la boca; enjuagues bucales de fluoruros, aquellos que ayudan a reforzar la capa de fluoruro del esmalte de los dientes; y enjuagues bucales remineralizadores, aquellos que ayudan a restaurar lesiones iniciales de caries.<sup>8</sup>

Actualmente los enjuagues bucales se formulan en base a la necesidad social del "aliento agradable". Recientes investigaciones han demostrado que la clorhexidina puede tener propiedades antiplaca e incluso anticaries; es por esto que se la encuentra presente en la mayoría de enjuagues bucales.<sup>8</sup>

Los enjuagues bucales desarrollan su acción total mediante la asociación de tres efectos: 1) efecto mecánico, mediante enjuague de los detritos alimenticios de la boca; 2) efecto antibacteriano, ejercido sobre la disminución de la flora bucal; y

3) efecto saborizante, debido a que el agente saborizante, en la mayoría de los casos, cumple un acción antibacteriana, pudiendo generarse un sinergismo entre el antibacteriano y el saborizante.<sup>8</sup>

Los agentes antibacterianos, empleados típicamente en enjuagues bucales incluyen a los fenoles clorados diluidos en terpinol en un 10-20%, al timol (Isopropilmetacresol) diluido entre el 5-20%, al peróxido de hidrógeno 10 vol. diluido en ocho partes de agua, al hexaclorofeno en un 0,02% dentro de una mezcla hidroalcohólica de 25% y a compuestos cuaternarios de amonio como cloruro de benzetonio y clorhexidina.<sup>8</sup>



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación de la investigación**

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Área de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y en el Laboratorio Microbiol S.A. de Lima, entre octubre 2012 a marzo 2013.

#### **3.2. Tipo de investigación**

La tipología de la investigación corresponde a un estudio aplicativo experimental.

#### **3.3. Población y muestra**

##### **3.3.1. Población**

Propóleo (propóleo de *Apis mellifera* "abeja") de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

##### **3.3.2. Muestra**

Un kg de propóleo (propóleo de *Apis mellifera* "abeja"), recolectado de 28 colmenas de abejas en el mes de octubre del 2012, en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

### 3.3.3. Unidad experimental

Cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, adquiridas por el Laboratorio Microbiol S.A. de ATCC®.

### 3.3.4. Sistema de muestreo

Tomando en consideración que no se conocía con precisión el tamaño de la población, se determinó el tamaño muestral con la siguiente fórmula: <sup>46</sup>

$$n = \frac{Z^2 pq}{B^2} = \frac{1,96^2 \times 0,5 \times 0,5}{0,05^2} = 384,15$$

Donde n= Tamaño de la muestra, z= 1,96 para el 95% de confianza, p=Frecuencia esperada del factor a estudiar, q= 1- p, B= Precisión o error admitido.

El valor de n obtenido por esta fórmula indica el tamaño de la muestra para una población infinita, considerando que en el presenta trabajo de investigación se dispone de una población pequeña (de propóleo de las colmenas ubicadas en el distrito de Luricocha), se aplica la siguiente fórmula: <sup>46</sup>

$$\frac{1}{n'} = \frac{1}{n} + \frac{1}{N} = \frac{1}{384,16} + \frac{1}{30} = 28$$

Donde n'= Tamaño de la muestra necesario, n= Tamaño de la muestra según la primera fórmula y N= Tamaño de la población con la que se cuenta.

Según lo calculado se realizó un muestreo aleatorio de 28 colmenas procedentes de la población.

## 3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos

### 3.4.1. Recolección de la muestra

El propóleo fue recolectado de las colmenas de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, entre los meses de setiembre y octubre, con la

ayuda de un especialista con experiencia en la recolección de este recurso natural. Se recolectó un aproximado de 1000 g y se procedió a envasarlo en frascos de vidrio ámbar estériles para su transporte.

El propóleo se recolectó bajo las condiciones higiénicas necesarias que impidieron la contaminación.

#### **3.4.2. Caracterización del propóleo según la norma de calidad internacional rusa RST RSFR 317-77**

Se compararon las características del propóleo recolectado en la provincia de Huanta departamento de Ayacucho con los parámetros establecidos por la Norma de Calidad Internacional Rusa RST RSFR 317-77 donde define los parámetros que debe cumplir el propóleo.

#### **3.4.3. Obtención del extracto de propóleo**

El extracto de propóleo se obtuvo siguiendo la metodología de Mayta y Sacsquispe,<sup>7</sup> Rodríguez<sup>20</sup> y Navarro.<sup>37</sup>

En el laboratorio se eliminaron las impurezas como restos de madera, de hojas, ceras, restos de abejas y otros.

Se congeló la masa de propóleo a temperatura de -20 a -30°C por 48 horas.

Se procedió a pulverizar la masa de propóleo con ayuda de un sistema mecánico.

La extracción se realizó con solución etanólica (etanol al 80%), en una proporción de 40 g de propóleo en 100 ml de la solución etanólica.

Se procedió a macerar por cinco días, agitando diariamente por 30 minutos.

Luego se filtró el extracto, con el uso de un papel filtro, separando el filtrado del sólido residual.

El extracto obtenido del filtrado se sometió a baño maría a 37°C hasta la evaporación y desaparición del solvente, quedando como residuo el extracto semifluido.

Se obtuvo un extracto semifluido de concentración 28%.

Se envaso el extracto en frasco estéril color ámbar, el cual se conservó en un lugar fresco y seco alejado de la luz.

A partir del extracto de propóleo obtenido, se formularon enjuagues bucales a diferentes concentraciones 4%; 2%; 1% y 0,5%.

#### **3.4.4. Elaboración de un enjuague bucal**

Los enjuagues bucales se elaboraron siguiendo la metodología de Rodríguez<sup>20</sup> y Mamani.<sup>43</sup>

Se elaboraron cinco formulaciones: cuatro con diferentes concentraciones (4%; 2%; 1% y 0,5%.) y un control, según Anexo 16.

En un vaso precipitado (01) se midió 10 ml de agua hervida caliente y se agregó la sacarina sódica, agitando con una varilla constantemente.

En un segundo vaso precipitado (02) se midió 10 ml. de agua hervida y se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se le agregó polisorbato 20.

Se procedió a calentar la solución del vaso precipitado (02) hasta 40°C y se le agregó el extracto semifluido de propóleo, propilparabeno, metilparabeno y propilenglicol, se mezcló constantemente por cinco minutos.

Se mezcló el vaso precipitado (01) con el vaso precipitado (02) obtenido anteriormente durante 10 minutos.

En un vaso precipitado (03) conteniendo 10 ml de agua hervida a 60°C, se añadió lentamente el sorbitol y la glicerina, hasta obtener una mezcla homogénea. Luego se adicionó esta solución a la anteriormente obtenida, agitando con una varilla por un tiempo de 30 minutos.

Se dejó enfriar y se filtró para obtener una solución translúcida.

#### **3.4.5. Identificación cualitativa de los fenoles**

Se identificó de manera cualitativa los principales metabolitos contenidos en el propóleo, los flavonoides mediante la reacción de Shinoda y los fenoles mediante la reacción con cloruro férrico.

#### **3.4.6. Evaluación de las características fisicoquímicas**

Se evaluaron las características organolépticas del enjuague bucal tomando en cuenta el color, olor, sabor, homogeneidad y pH.

#### **3.4.7. Prueba de actividad antibacteriana**

##### **3.4.7.1. Preparación del inóculo**

Una vez adquiridas las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, éstas fueron reactivadas incubándolas en caldo Casoy más lactosa a 37°C por 48 horas.<sup>44, 45</sup>

El día de la prueba se preparó el inóculo en solución salina al 0,85%, obteniendo una suspensión bacteriana con una turbidez aproximada a 0,5 en la escala de Mc Farland.<sup>44' 45</sup>

##### **3.4.7.2. Preparación de las placas de ensayo**

Se preparó 13 placas cada una con 21 ml de agar Antibiótico N° 11 como base y 4 ml de agar Antibiótico N° 1 inoculado con la suspensión bacteriana en una proporción de 1 ml por cada 100 ml de agar.

Una vez solidificada la segunda capa de agar se separaron 12 placas y con ayuda de una pinza estéril se colocaron los cilindros de acero inoxidable en tres regiones equidistantes de la placa (una distancia no menor de 15 mm entre si y a 1,5 cm del borde de la placa). Las dimensiones del cilindro de acero inoxidable

es el siguiente: Diámetro interno 6 mm +1 mm, diámetro externo 8mm + 1mm y longitud de 10mm + 1mm.

Adicionalmente se utilizó un control negativo del medio sin inocular.

### 3.4.7.3. Enfrentamiento

Por cada concentración de enjuague bucal se utilizaron tres placas inoculadas y en cada cilindro se añadió 200 ul de las soluciones de prueba (blanco, control y muestra).

Las placas se llevaron a incubación a 37°C durante 48 horas.

Trascurrido el tiempo de incubación se procedió a la medición de los halos de inhibición, utilizando un vernier digital calibrado.

Tabla 02. Distribución de los enjuagues bucales por cada placa inoculada con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Nº Placa Petri	Clorhexidina al 0,12% control	Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"				Enjuague bucal base
		4%	2%	1%	0,50%	Blanco
Placa 01		X				X
Placa 02	X	X				X
Placa 03						
Placa 04						
Placa 05	X		X			X
Placa 06						
Placa 07						
Placa 08	X			X		X
Placa 09						
Placa 10						
Placa 11	X				X	X
Placa 12						

### 3.5. Recolección de datos

El proceso de recolección de datos se realizó de manera manual mediante la aplicación en una tabla de recolección de datos, donde se registró la sensibilidad

de la bacteria a los enjuagues bucales y el tamaño del halo de inhibición. La tabulación de los datos se realizó en una computadora.

### 3.6. Análisis de datos

Se determinó el diámetro del halo de inhibición de cada uno de los tratamientos, se calculó la media, la desviación estándar, las diferencias entre los tratamientos se evaluaron mediante la prueba de análisis de varianza y la prueba complementaria de Tukey con un 95% de confianza ( $\alpha=0,05$ ), utilizando el programa SPSS 20.

Así mismo, se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de la muestra}}{B^2 \text{ Diámetro del halo de control}} \cdot 100$$

#### **IV. RESULTADOS**



Tabla 03. Características organolépticas y especificaciones del propóleo de *Apis mellifera* "abeja".

<b>Características</b>	<b>Especificaciones</b>	<b>Resultados</b>
Aspecto externo	Pelotas granos o briquetas	Cumple
Color	Verde oscuro, pardo o gris con matices verde, amarillo, Castaño oscuro o rojo.	Cumple
Olor	Característico, resinoso, aromático (la mezcla de olores de la miel) de las hierbas aromáticas.	Cumple
Sabor	Amargo, algo fuerte	Cumple
Estructura	Espesa, con deformaciones heterogéneas	Cumple
Consistencia	De 20 a 40° C es viscoso a menos de 20° C es dura.	Cumple
Cera	No más del 30 %	Cumple
Reacción cualitativa ante los compuestos flavonoides.	Positiva	Cumple

Tabla 04. Características organolépticas de cuatro enjuagues bucales de propóleo.

Características	Enjuague bucal con 0,5%	Enjuague bucal con 1 %	Enjuague bucal con 2 %	Enjuague bucal con 4 %	Control	Blanco
Aspecto	Líquido translucido	Líquido translucido	Líquido translucido	Líquido translucido	Líquido translucido	Líquido translucido
Color	Amarillo claro translucido	Amarillo claro translucido	Amarillo translucido	Amarillo translucido	Blanco traslucido	Amarillo translucido
Olor	Sui generis	Sui generis	Sui generis	Suigeneris	Sin olor	Sui generis
Sabor	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo
pH	6,1	5,8	6,5	6,8	5,7	6,8

Tabla 05. Presencia de los halos de inhibición de los enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Halo de inhibición		Clorhexidina al 0,12%	Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"				Enjuague bucal base
		Control	0,5%	1%	2%	4%	Blanco
PLACA 01	SI	X	X				X
	NO						
PLACA 02	SI	X	X				X
	NO						
PLACA 03	SI	X	X				X
	NO						
PLACA 04	SI	X		X			X
	NO						
PLACA 05	SI	X		X			X
	NO						
PLACA 06	SI	X		X			X
	NO						
PLACA 07	SI	X			X		X
	NO						
PLACA 08	SI	X			X		X
	NO						
PLACA09	SI	X			X		X
	NO						
PLACA 10	SI	X				X	X
	NO						
PLACA 11	SI	X				X	X
	NO						
PLACA 12	SI	X				X	X
	NO						

Tabla 06. Análisis estadístico de los diámetros de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Valores estadísticos	Clorhexidina al 0,12%	Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"				Enjuague bucal base
	control	0,5%	1%	2%	4%	Blanco
Media	24,15	19,14	19,79	21,18	21,53	14,05
Desviación estándar	1,17	0,15	0,37	0,67	0,48	0,47
Mínimo	22,08	18,98	19,44	20,62	21,00	13,42
Máximo	25,27	19,27	20,17	21,92	21,92	14,93

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo

Tabla 07. ANVA y prueba de Tukey de los diámetros de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

	N	Media	ANVA	Prueba de Tukey					
				Blanco	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%	Control
Blanco	12	14,06			P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*
0,5%	3	19,14		P=0,000*			P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*
1,0%	3	19,79	0,000**	P=0,000*					P=0,000*
2,0%	3	21,18		P=0,000*	P=0,000*				P=0,000*
4,0%	3	21,54		P=0,000*	P=0,000*				P=0,000*
Control	12	24,15		P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	

\*\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas (ANVA).

\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas (Comparaciones pareadas prueba de Tukey)

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo

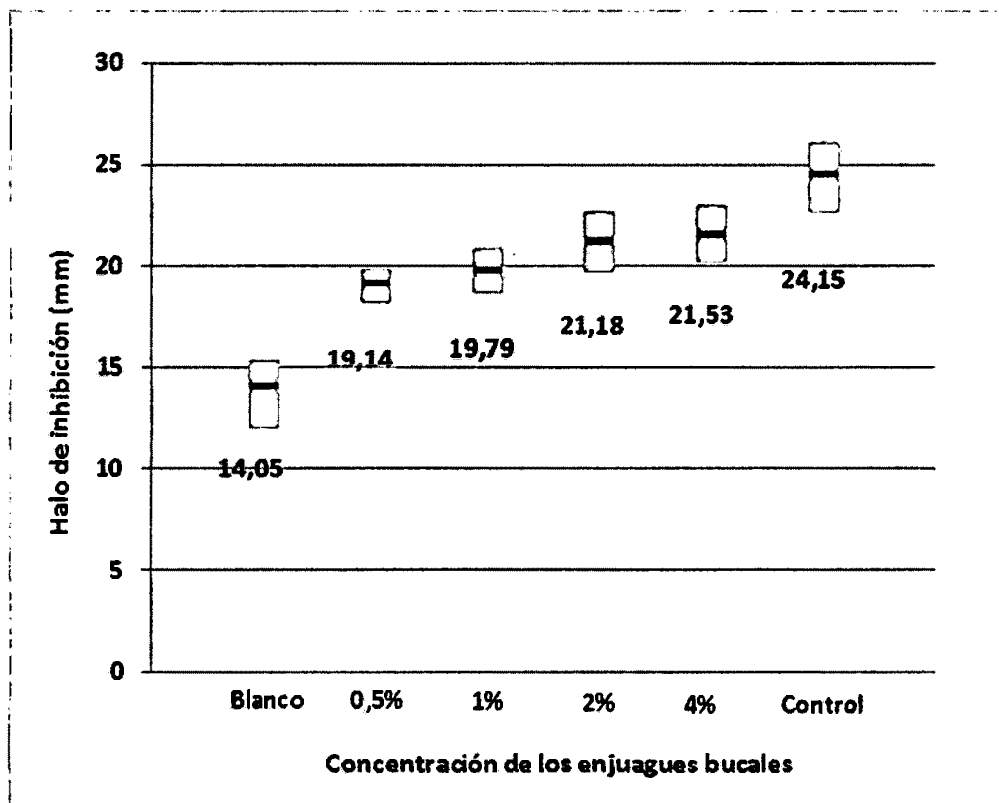


Figura 02. Variación de los halos de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

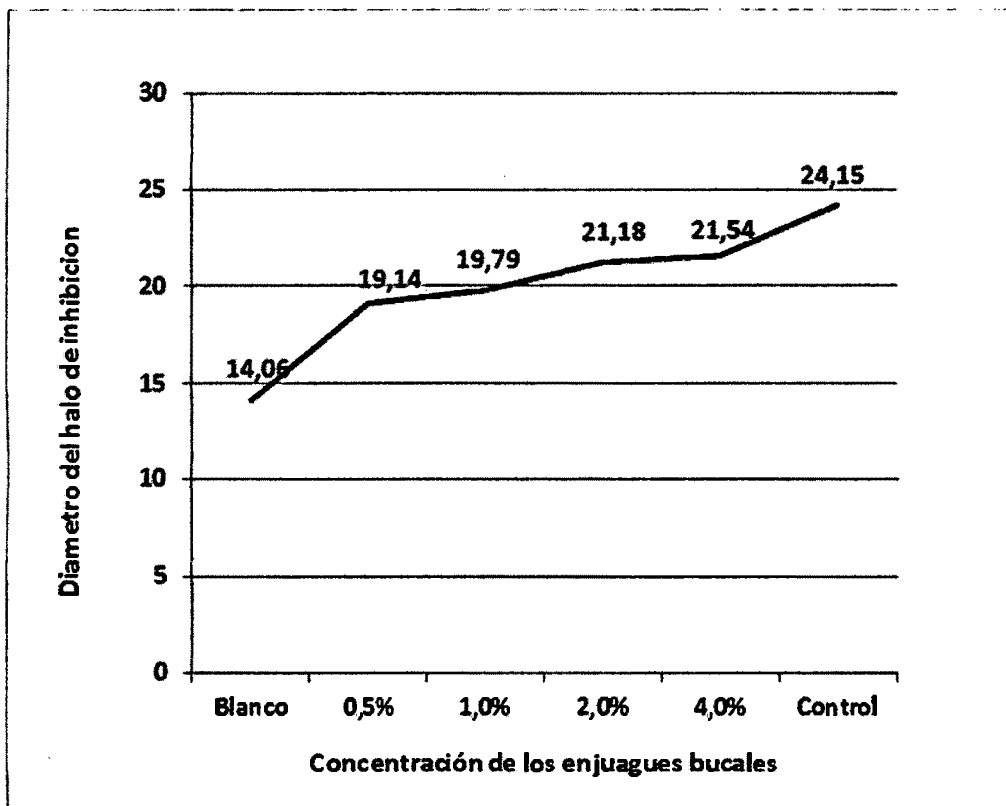


Figura 03. Tendencia del diámetro promedio del halo de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Tabla 08. Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Valores estadísticos	Clorhexidina al 0,12%	Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"				Enjuague bucal base Blanco
	control	0,50%	1%	2%	4%	Blanco
Media	100	76,72	78,83	87,51	96,40	58,34
Desviación estándar	0	0,94	1,40	2,81	1,19	0,47
Mínimo	100	75,77	77,23	84,44	95,11	53,34
Máximo	100	77,64	79,82	89,95	97,47	63,65

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo



Tabla 09. ANVA y prueba de Tukey del porcentaje de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

	N	Media	ANVA	Prueba de Tukey					
				Blanco	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%	Control
Blanco	12	58,34			P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,00 *
0,5%	3	76,72		P=0,00 *			P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,00 *
1,0%	3	78,83	0,000**	P=0,00 *			P=0,01 *	P=0,00 *	P=0,00 *
2,0%	3	87,51		P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,01 *		P=0,01 *	P=0,00 *
4,0%	3	96,40		P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,01 *		
Control	12	100		P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,00 *	P=0,00 *		

\*\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas (ANVA).

\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas (Comparaciones pareadas prueba de Tukey)

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo

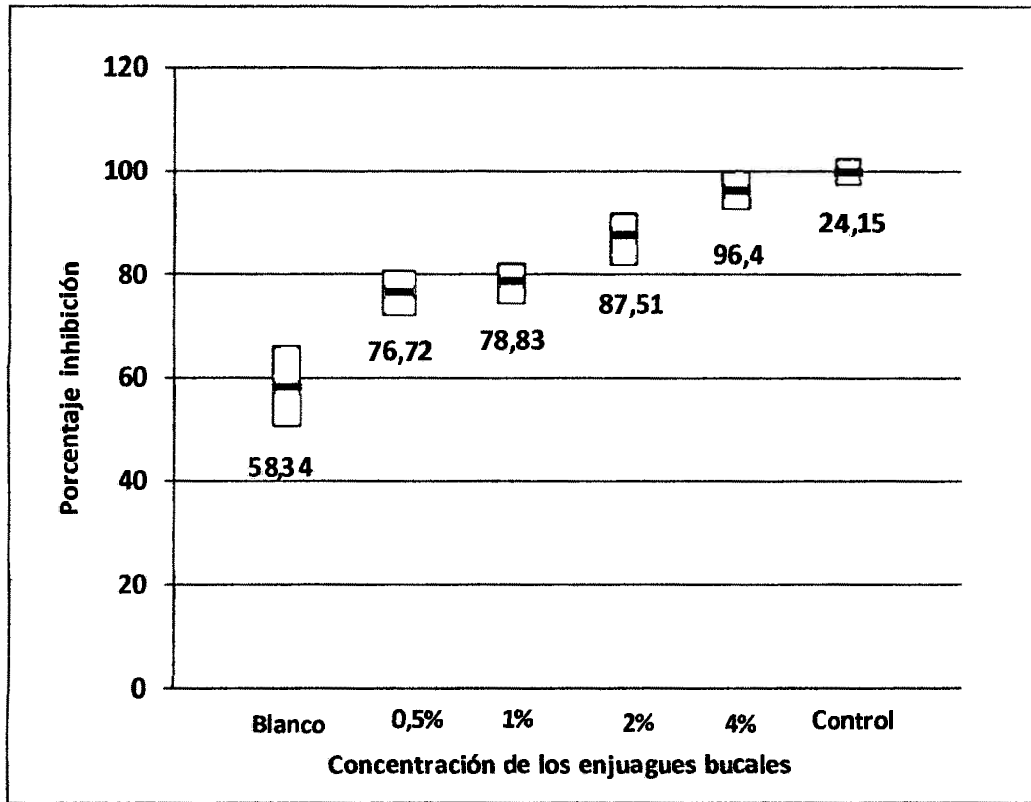


Figura 04. Porcentaje de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

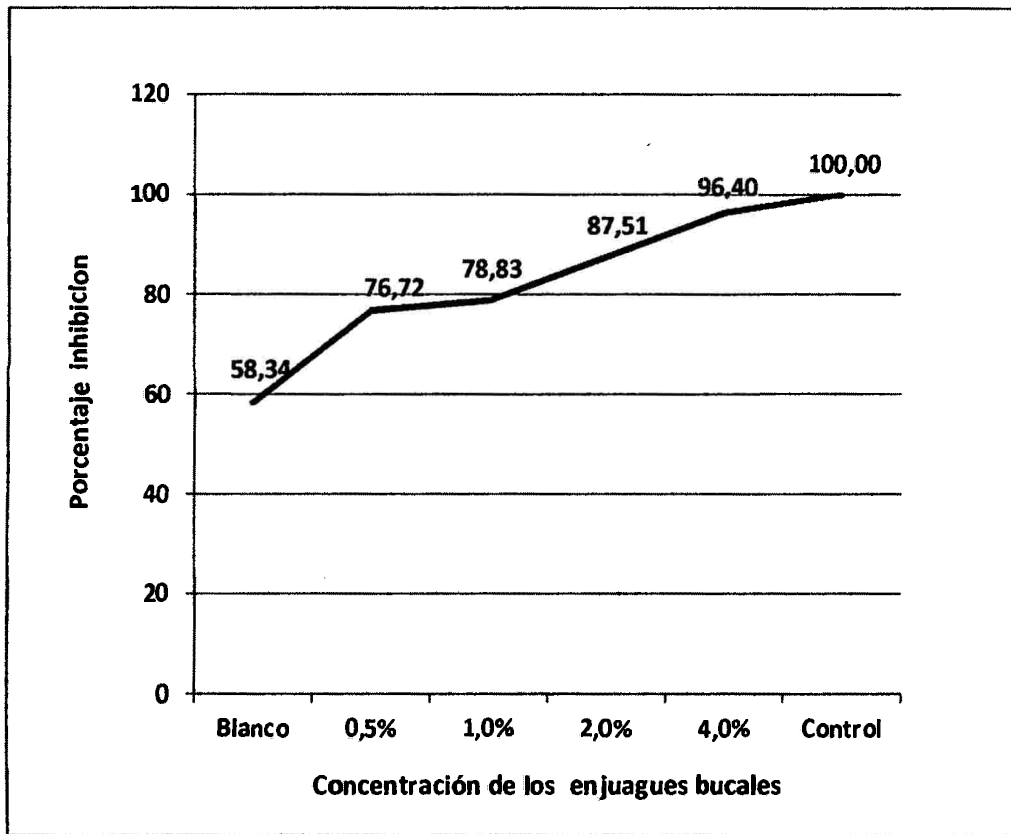


Figura 05. Tendencia del porcentaje de inhibición promedio según concentración de enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## V. DISCUSIÓN

Se buscó evaluar si los enjuagues bucales elaborados a base de extracto etanólico de propóleo a concentraciones de 0,5%; 1%; 2% y 4% poseen actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, comparándola con un enjuague bucal con clorhexidina al 0,12% normalmente utilizado.

Se observó que las características organolépticas del propóleo proveniente de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho cumplió con las especificaciones señaladas en la Norma de Calidad Rusa RST RSFR 317-77 (Tabla 03). Así mismo queda confirmado que el propóleo es una mezcla compleja que contiene principalmente fenoles y que su composición y características dependen del origen de la muestra, considerando hasta 160 posibles compuestos fenólicos con actividad farmacológica<sup>6</sup>; también se comprobó que los flavonoides son el principal compuesto fenólicos del propóleo y están asociadas a sus propiedades médicas<sup>36</sup>; que la composición y las características organolépticas están ligada principalmente a la flora del área ecológica<sup>33,15</sup>; sin embargo, existen sustancias que se encuentran en el propóleo de modo constante y relativamente estable; entre los cuales se puede mencionar a los fenoles, sustancias responsables del efecto antibacteriano de cualquier variedad de propóleo.

Los enjuagues bucales elaborados presentaron características organolépticas que le asignan sus excipientes y su principio activo (Tabla 04), resultando ser un medio ideal para la incorporación de un principio activo antibacteriano como el propóleo; de lo anteriormente mencionado se destacan a las investigaciones donde se incorporaron aceites esenciales en la formulación de su enjuague bucal para demostrar la actividad antibacteriana<sup>26,43</sup>; así mismo, cabe mencionar la existencia de estudios sobre preparados para la higiene bucal, utilizados para determinar el efecto antibacteriano de microorganismos de la cavidad oral, otros autores plantearon la elaboración de un gel dental de propóleo evaluando el efecto antibacteriano del mismo frente a cepas de *Streptococcus mutans*.<sup>9</sup>

Se obtuvo que todos los enjuagues bucales elaborados poseen actividad antibacteriana evidenciada por la presencia de los halos de inhibición (Tabla 05), atribuyendo dicho efecto al propóleo, con lo cual verifico los estudios de las propiedades antibacterianas del extracto etanólico de propóleo mas no así de enjuagues bucales elaborados a base de propóleo<sup>16,11</sup>, siendo está una limitante; también se mencionó que los enjuagues bucales son formulaciones líquidas que pueden poseer efecto antibacteriano, empleándose típicamente como agente antibacteriano a los fenoles, compuesto que se encuentra en el propóleo.<sup>8</sup>

Por otra parte los diámetros de los halos de inhibición obtenidos (Tabla 06) permiten apreciar que el enjuague bucal base (solo excipientes) presenta un halo de inhibición bacteriana, significativamente menor en tamaño que los EBEEP al 0,5%; 1%; 2%; 4%; y el control ( $P < 0,05$ ), atribuyendo dicho efecto principalmente a los parabenos, compuesto químico utilizado habitualmente en las industrias cosmética y que actúan de manera efectiva como conservantes teniendo además propiedades bactericidas;<sup>23</sup> considerando al blanco como patrón de comparación en la presente investigación; asimismo el EBEEP al 4%

posee un mayor tamaño de halo de inhibición bacteriana que las otras concentraciones pero menor que el control y el EBEEP al 0,5% solo supera en tamaño al blanco. De lo antes mencionado surgió el propósito del estudio, el cual fue demostrar la actividad antibacteriana de enjuagues bucales elaborados a base de extracto etanólico (EBEEP), frente a cepas de *S. mutans*; logrando demostrar que existen diferencias significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición en las distintas concentraciones de enjuagues bucales de extracto etanólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" (0,5%; 1%; 2%; 4%).

Por lo antes mencionado se realizó un análisis estadístico de los diámetros obtenidos (Tabla 07), considerando que según en el análisis ANVA al menos uno de las concentraciones del EBEEP es significativamente diferente al blanco, al control o a las otras concentraciones de EBEEP. Asimismo, según el análisis Tukey se demostró que a pesar de existir una relación directamente proporcional entre el tamaño de los halos y las concentraciones, el EBEEP al 4% es significativamente mayor frente al EBEEP al 0,5% y 1% ( $P < 0,05$ ) pero significativamente igual al EBEEP al 2% ( $P > 0,05$ ) y el EBEEP al 2% es significativamente mayor frente al EBEEP al 0,5% ( $P < 0,05$ ) pero significativamente igual al EBEEP al 4% y 1% ( $P > 0,05$ ); también se encontró que EBEEP al 1% es significativamente igual al EBEEP al 2% y 0,5%; considerando también al EBEEP al 0,5% como significativamente igual al EBEEP al 1% ( $P > 0,05$ ); lo cual coincide con investigaciones que demostraron que a mayor concentración el tamaño del halo es mayor, no existiendo a pesar de ello una diferencia significativa entre las concentraciones contiguas.<sup>7</sup>

Por otra parte se pudo demostrar que el porcentaje de inhibición bacteriana obtenido (Tabla 08) es de un 100% para el enjuague con clorhexidina al 0,12% (control), encontrándose al EBEEP al 4% con una concentración muy cercana a

la ideal por tener con un valor promedio de 96,40±1,19%. Realizando el respectivo análisis estadístico a los porcentajes de inhibición (Tabla 09) se confirmó con ANVA que al menos uno de los grupos presenta un porcentaje de inhibición significativamente diferente, definiendo con el análisis de Tukey que el EBEEP al 4% tiene un porcentaje de inhibición bacteriana significativamente mayor frente al EBEEP al 0,5%; 1% y 2% ( $P < 0,05$ ) pero significativamente igual al control ( $P > 0,05$ ). Los estudios realizados por Mayta y Sacsquispe<sup>7</sup> y Dantas *et al.*<sup>14</sup> demuestran que la actividad antibacteriana del propóleo en comparación a la clorhexidina al 0,12% no supera su efecto, coincidiendo con lo obtenido en la presente investigación cuyo porcentaje de inhibición resultante es semejante entre el EBEEP al 4% y el enjuague bucal que contiene clorhexidina al 0,12% no llegando a superar el efecto de esta último.

Analizando los resultados obtenidos en el presente estudio se puede compararlas las concentraciones de EBEEP al 0,5%; 1%; 2% y 4% con concentraciones similares utilizadas en otros estudios<sup>18</sup> sobre la actividad antibacteriana de la solución hidroalcohólica de propóleo al 4% frente a cepas de microorganismos de la cavidad oral como los *Streptococcus*; investigaciones comparativas sobre la actividad antibacteriana del extracto de propóleo al 0,37%, usado sobre bacterianas orales comunes entre ellas el *Streptococcus mutans*<sup>19</sup> y un estudio en 50 escolares con antecedentes de alta infección por *Streptococcus mutans*, quien verificó la actividad anticaries de una crema dental que contiene 0,8 g de extracto de propóleo;<sup>17</sup> demostrándose en los tres casos una actividad antibacteriana considerable.

Por todo lo anteriormente mencionado es posible justificar su acción antibacteriana en estudios que mencionan un posible efecto de los flavonoides frente a microorganismo orales, por la inhibición de la enzima glucosiltransferasa

evitando la formación de glucanos, demostrando *in vitro* la actividad antibacteriana frente *Streptococcus mutans*.<sup>39</sup> Otros autores observaron que la acción antibacteriana del propóleo utilizaba varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, evitando la división celular, desorganizado el citoplasma, la membrana citoplasmática, y la pared celular, causando una bacteriólisis parcial, e inhibiendo la síntesis de proteína.<sup>40</sup>

De esta manera, al contrastarse los resultados obtenidos por los autores mencionados con los del presente trabajo de investigación se establece la acción antibacteriana de los EBEEP al 4%; 2%; 1% y 0,5%, lo que confirma la hipótesis, encontrándose diferencias y similitudes significativas ya mencionadas, entre las concentraciones que puede asociarse también al método aplicado en el presente estudio (cilindro en placa) así como los medios utilizados (agar antibiótico N° 11 y N°01) que permitieron obtener resultados más claros. Por lo antes expuesto el presente estudio sirve como base para que posteriormente se continúe ampliando los conocimientos sobre el propóleo y su uso potencial como antibacteriano en diferentes formulaciones.



## VI. CONCLUSIONES

- Los enjuagues bucales con extracto etanólico de propóleo al 0,5%; 1%, 2%; 4% cumplen con las características establecidas para los enjuagues bucales.
- Los enjuagues bucales elaborados con extracto etanólico de propóleo al 0,5%; 1%; 2%; 4%, poseen actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 directamente proporcional a su concentración, superando al blanco mas no así al control con clorhexidina 0,12%.
- Los enjuagues bucales elaborados con extracto etanólico de propóleo al 0,5%; 1%; 2%; 4%, presentaron un porcentaje de inhibición directamente proporcional a su concentración superando al blanco resultando con valores similares al control con clorhexidina 0,12%.
- El enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo al 4% posee similar actividad antibacteriana que el enjuague bucal con clorhexidina al 0,12% (control) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## VII. RECOMENDACIONES

- Estandarizar los propóleos ayacuchanos de acuerdo a la Norma de Calidad Rusa RST RSFR 317-77.
- Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) y Concentraciones Mínimas Tóxicas (CMT) del extracto de propóleo ayacuchano.
- Realizar estudios de estabilidad a los enjuagues elaborados a base de extracto etanólico de propóleo.
- Modificar los excipientes utilizados en la elaboración del enjuague bucal, para mejora su sabor.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Madrid M, Castro A, Echeandía J, Chein S, *et al.* Modelo de atención integral de salud en Pachacútec. Revista científica Odeontología Sanmarquina. [Revista en línea] 2011 [Consultado julio 2012]; 14 (1) Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011\\_n1/pdf/a03.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a03.pdf)
2. Ministerio de Salud. Plan de Salud Bucal. Dirección General de Salud de las Personas. [monografía en Internet]. Perú: MINSA; 2012. [consultado julio 2012]. Disponible en: [http://www.minsa.gob.pe/portada/est\\_san/saludbucal.htm](http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm)
3. Bravo A, Díaz L, Armas L. Tratamiento de la alveolitis dental con tintura de propóleos al 5 %. Revista Cubana de Farmacia. [Revista en línea] 2012. [consultado julio 2012]; 46 (1). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034152012000100012&script=scarttext&tlng=pt>
4. Baumgarten P . Actividad antimicrobiana de extractos y tintura propóleo en cepas de *Streptococcus mutans*. Revista Investigación Científica del Instituto de Investigaciones Odontológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. [Revista en línea] 2006 [Consultado julio 2012]; 3(2). Disponible en: <http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/ricvol3num2especial/Ciencias%20de%20la%20Salud/Actividad%20antimicrobiana%20-%20Paloma%20Baumgarte.pdf>
5. Samara N, Benítez N, Cabezas F. Actividad antibacterial y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. Artículos de Investigación Científica y Tecnológica del Departamento de Biología de la Universidad de Cauca. [Revista en línea] 2011 [consultado julio 2012]; 1(1). Disponible en: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol9-1/ACTIVIDAD%20ANTIBACTERIANA%20Y%20COMPOSICION%20CUALITATIVA%20DE%20PROPOLEOS.pdf>
6. Banova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences [Revista en línea] 2005 [consultado julio 2012]; 100(1-2). Disponible en: <http://lib.bioinfo.pl/pmid:15993016>
7. Mayta F, Sacsquispe S. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa- Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* [Tesis]. Lima: Facultad de Estomatología Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2009.
8. Santa María H. Dermofarmacia Manual de prácticas. 2a ed. Lima-Perú: Editorial Sanmarquina; 2008.
9. Ayala C. Desarrollo de un gel dental de propóleo y su efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Streptococcus mutans*. [Tesis pregrado]. Trujillo: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNT; 2010.

10. Moromi H. Antibacterianos naturales: estudios en la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Revista científica Odontología Sanmarquina. [serie en internet] 2009 [acceso julio 2012]; 12(1): Disponible en: <http://lib.bioinfo.pl/pmid:15993016>
11. Koru O, Toksoy F, Acikel CH, Tunca YM, Baysallar M, Uskudar GA, Akca E, Ozkok TA, Sorkun K, Tanyuksel M, Salih B. Actividad antimicrobiana in vitro de las muestras de los propolis de diversos orígenes geográficos contra ciertos patógenos orales. Revista Anaerobe del Departamento de Microbiología, división de parasitología médica, Escuela Médica Militar de la academia de Gulhane de medicina. [Revista en línea] 2007 [consultado julio 2012]; 13(1). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475517>
12. Eguizábal Al M, Moromi H. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. [Tesis pregrado] Lima: Facultad de Odontología UNMSM; 2007.
13. Bruschi L, Lara H, Martins H, Vinholis H, Casemiro A, Panzeri H, Gremião P. Preparación y actividad antimicrobiana de macropartículas de gelatina que contienen propóleo contra patógenos orales. Drug Development and Industrial Pharmacy of Brasil: Facultad de Odontología de Ribeirão Preto. [revista en línea] 2006 [consultado Agosto 2012]; 32(2):229-238. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/03639040500466312>.
14. Dantas RV., Díaz R, Vieira MS, Queiroz M, Pereira J, Nacimiento W W. Efecto clínico de una solución antiséptica a base de propóleos en niños con caries activa. Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Brasil: Universidad Federal de Paraíba [revista en línea] 2006 [consultado Agosto 2012]; 6(001): 87-92 Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63760114> .
15. Cassina CN, Oliva AL, Cuosta OL, De Simone M. Propiedades antibacterianas de propóleo cubanos. Universidad Nacional de Rio Cuarto. Cuba. [serie de internet] 2006 [acceso Agosto 2012]; 1(1): 1p. Disponible en: [http://www.silae.it/docs/atti\\_xv\\_congresso.pdf](http://www.silae.it/docs/atti_xv_congresso.pdf)
16. Fajuri M, Huertas J, Silva N. Eficacia del propóleo chileno como antimicrobiano contra microorganismos de interés en Odontología. [Tesis pregrado]. Chilo: Facultad de Odontología, Universidad de Chile; 2004.
17. Gispert E, Cantillo E, Rivero A, Padrón M. Actividad anticaries de una crema dental con propóleos. Revista Cubana de Estomatología; [revista en línea] 2010 [consulta: Agosto 2012]; 37(3). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475072000000300006&script=sci\\_art\\_ext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475072000000300006&script=sci_art_ext).
18. Gutiérrez S, Romero C, Hidalgo C, Pérez O, Díaz B. Acción antibacteriana de la tintura hidroalcohólica de propóleo al 4% en gérmenes de origen endodóntico. Revista electrónica Archivos médicos de Camagüey, Cuba. [revista en línea] 2012 [consultado Agosto 2012]; 6(001): 87-92 Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63760114> .
19. Solórzano DG. Estudio comparativo in vitro sobre el efecto antibacteriano del extracto de propóleo, paramonoclorofenol alcanforado e hidróxido de

- calcio en necrosis pulpar [Tesis pregrado]. Huánuco: Facultad de Ciencias de la Salud; 2011.
20. Rodríguez MA. Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar. [Tesis pregrado]. Lima: Facultad de Odontología UNMSM; 2012.
  21. Torres JC. [Sede Web], Managua, Nicaragua: Fitoterapia. Centro de medicina biológica. 2000.[actualizada en 2011; acceso julio 2012]. <http://cmbdrtorres.galeon.com/>
  22. Del Rio P I. Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio in vitro. [Tesis pregrado]. Chile: Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Santiago; 2006.
  23. Zari G, Villalobos J. De los Ríos E, Ruiz S. Guía de prácticas de Farmacognosia II, Departamento de Farmacotécnica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNT. 1a ed .Trujillo-Perú; 2007.
  24. Taylor M, Dawson J. Lo esencial en Farmacología. 2a ed. España: Elsevier; 2003.
  25. Tresierra A, Bendayán A, García D. Capacidad antibiótica de cepas de *Streptomyces* frente a agentes etiológicos de dermatomicosis. Rev. Folia Amazónica de Iquitos. [revista en línea] 2012 [consultado Agosto 2012]; 1199; 6(1): 1-5. Disponible en: [http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/Folia6\\_articulo15.pdf](http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/Folia6_articulo15.pdf)
  26. Rodríguez D. Proceso y conceptos de las enfermedades más prevalentes en Estomatología. Estomatología preventiva y Servicio a la comunidad 1 Lima-Perú. [Clase Magistral] 2005. [consultado Agosto 2012]. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/2387063/Clase-3-Enf-mas-prevalentes-Caries-Denta>.
  27. Sosa M. Evolución de la fluoruración como medida para prevenir la caries dental. Revista Cubana de la Salud Pública. [revista en línea] 2003 [consultado agosto 2012]; 29(3):20-27. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-34662004000400011&script=sciarttext>
  28. Estrada J, Pérez J, Hidalgo I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Revista Cubana de estomatología. . [revista en línea] 2006 [consultado julio 2012]; 43(1):6. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0034-75072006000100007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0034-75072006000100007)
  29. Castro V. Inhibición del crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* por papaina y sanitrend. [Tesis pregrado]. Santiago – Chile: Facultad de Odontología. Universidad de Chile; 2005.
  30. Díaz K. Determinación de la actividad antibacteriana “in vitro” de *Mintostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. [Tesis pregrado]. Lima: Facultad de Odontología UNMSM; 2005.
  31. Carrillo M, Castillo N, Mauricio R. Evaluación de la actividad Antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). Rev. Cien. Inv. Agr. Scielo. [revista en línea] 2008 [consultado julio 2012]; 35(1): 17-26p.

- Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642011000500004&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-07642011000500004&script=sci_arttext)
32. López J, Ubillus M. (2004). Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa como materia prima para su utilización a nivel industrial. [Tesis pregrado]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM; 2004.
  33. Gómez A, Gómez M, Arrez D, Segura A, Fernández A. Advance in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [revista en línea] 2006 [consultado julio 2012]; 41(1): 1220–1234p. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621403>
  34. Chaillou LL. Estudio del propóleo de Santiago del Estero. Argentina. *Rev. Cienc. Tecnol. Aliment. Scielo*. [revista en línea] 2004 [consultado julio 2012]; 24(1). Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612004000100003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000100003)
  35. Marcucci M. Propolis: Chemical Composition biological properties and therapeutic activity. *Journal of apidologia of Universidade Estadual de Campinas, Brazil*. [revista en línea] 2003 [consultado julio 2012]; 26(1):83-89p. Disponible en: [http://www.apidologie.org/index.php?option=com\\_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/pdf/1995/02/Apidologie\\_0044-8435\\_1995\\_26\\_2\\_ART0002.pdf](http://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/pdf/1995/02/Apidologie_0044-8435_1995_26_2_ART0002.pdf)
  36. Bruschi ML, Franco SL, Gremiao MP. Aplicación of an HPLC method for analysis of propolis extract. *Journal of liquid Chromatography & Related Technologie*. [revista en línea] 2003 [consultado julio 2012]; 26 (14): 2399-2409p. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-120023254>
  37. Navarro A. Actividad fotoprotectora de crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en ratas albinas Holtzman [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas; 2011.
  38. Bonhevi JS, Coll F, Jorda R. The composition active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. [revista en línea] 2004 [consultado julio 2012]; 71(1):529-532p. Disponible en: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02540666#>
  39. Calderón A. Actividad antibacteriana in vitro de soluciones de propóleo etanólico sobre dos bacterias periodontopatogenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal. Hospital Militar Central [Tesis pregrado]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM; 2010.
  40. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Pubmed.gov*. Kinshasa, Zaire. [revista en línea] 2004 [consultado julio 2012]; 60(3): 222-227p. Disponible en: <https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-959463>

41. Fernandez SG, Aleman E, Figueroa B, Fagoaga E, Rivera J, Purroy A. Direct and airborne contact dermatitis from propolis in Beekeepers. Contact Dermatitis of Pamplona, Spain. [serial on the Internet] 2004 [cited 2012 Aug]; 50(1): [about 1 p]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.0105-1873.2004.00341g.x/abstract>
42. Silverman J, Wilder R. Enjuagues bucales antimicrobianos como parte de un régimen integral de cuidado oral. The Journal of the American Dental Association. [revista en línea] 2008 [consultado julio 2012]; 139(3):252. Disponible en: [http://jada-plus.com/content/137/suppl\\_3/22S.short](http://jada-plus.com/content/137/suppl_3/22S.short)
43. Mamani JR. Actividad antibacteriana del enjuague bucal formulado a base de aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* "cedron" frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas; 2011.
44. Alvarado V. Plantas medicinales: efecto antibacteriano in vitro de *Plantago major* L., *Erithroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camelia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. Revista científica odontología Sanmarquina. [revista en línea] 2010 [consultado agosto 2012]; 13(2): 21-25p. Disponible en: [http://www.odontologia-unmsm.edu.pe/revista\\_cientifica\\_odontologica\\_2010\\_II.pdf#page=22](http://www.odontologia-unmsm.edu.pe/revista_cientifica_odontologica_2010_II.pdf#page=22)
45. USP 35. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario nacional [CD-ROM]. Estados Unidos de América; 2012.
46. Enric M, Jordi C. Tamaño de la muestra. Universitat Autònoma de Barcelona, Rev. Epidem. Med. Prev. Barcelona, España. [revista en línea] 2003 [consultado julio 2012]; 1: 8-14p. Disponible en: [http://www.epidemiologia.com/epidemiologia/img/datos/21\\_06\\_58\\_2TamanoMuestra3.pdf](http://www.epidemiologia.com/epidemiologia/img/datos/21_06_58_2TamanoMuestra3.pdf)

## ANEXOS



Anexo 01



Figura 06. Obtención del extracto de propóleo

Anexo 02



Figura 07. Elaboración de los enjuagues bucales

Anexo 03

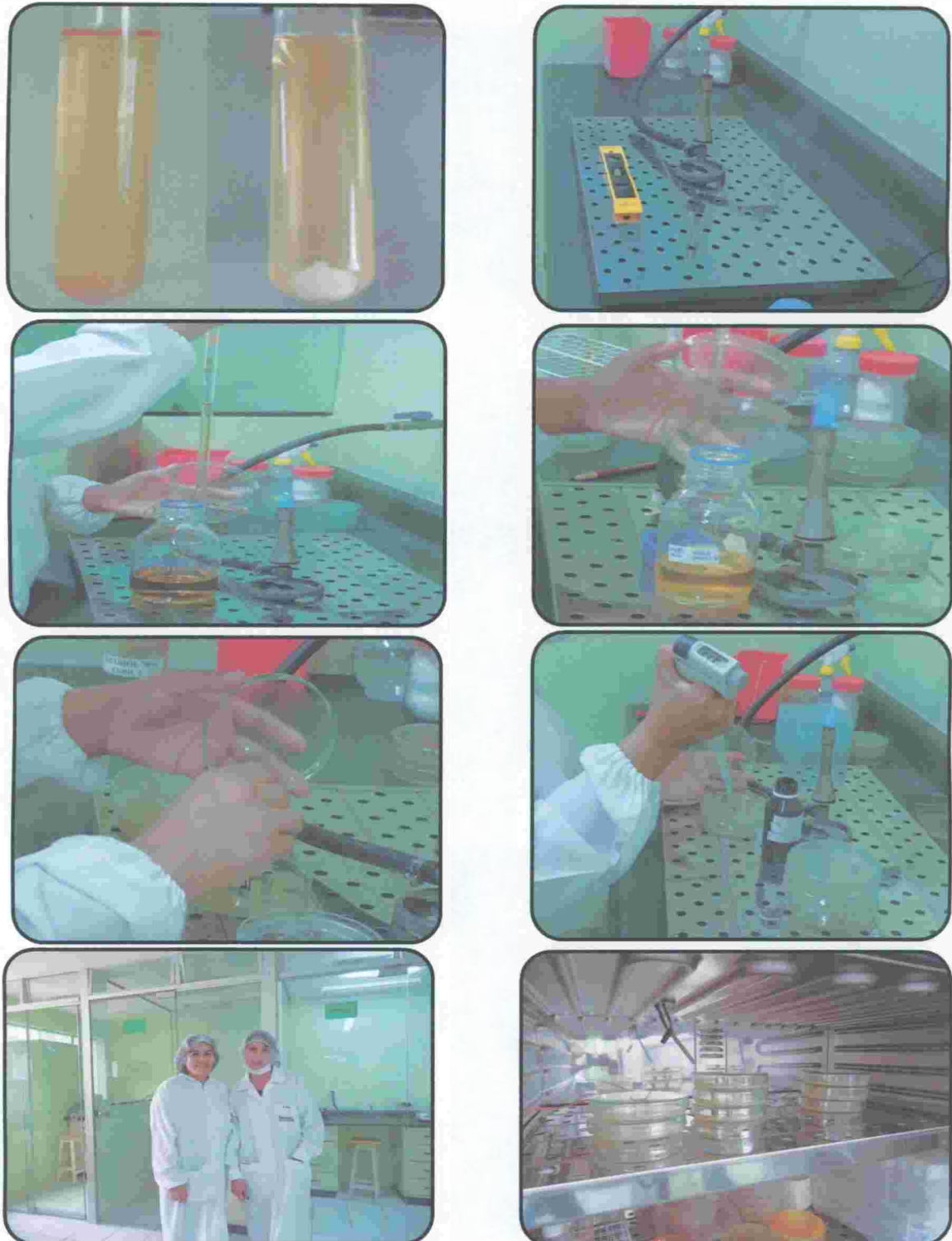


Figura 08. Sembrado de las cepas de *Streptococcus mutans* por incorporación

Anexo 04

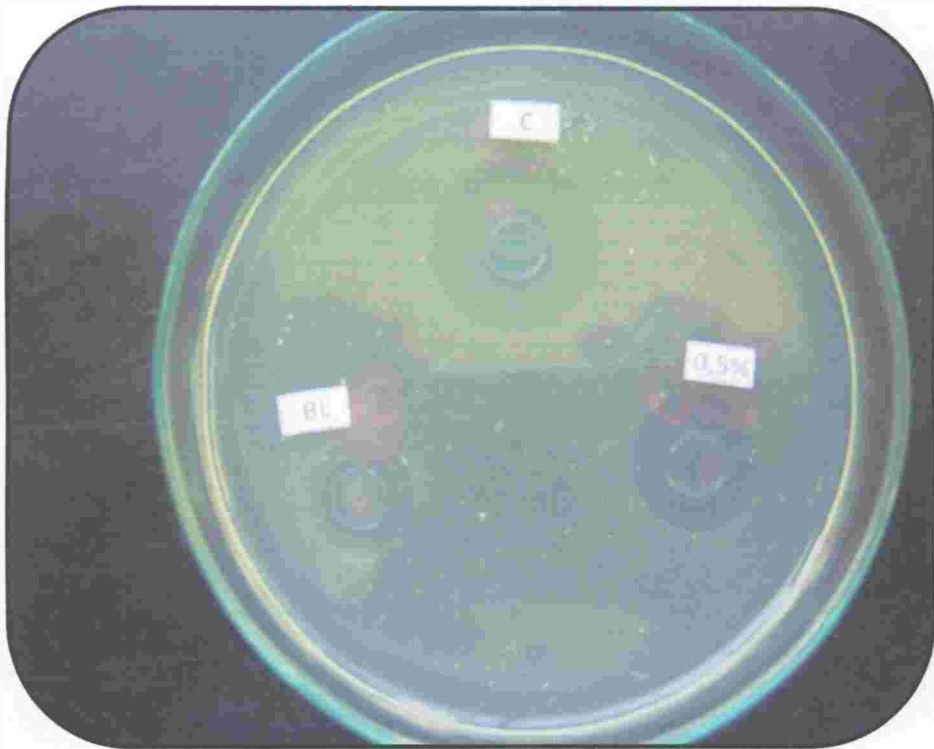


Figura 09. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 0,5% con su respectivo control y blanco

Anexo 05

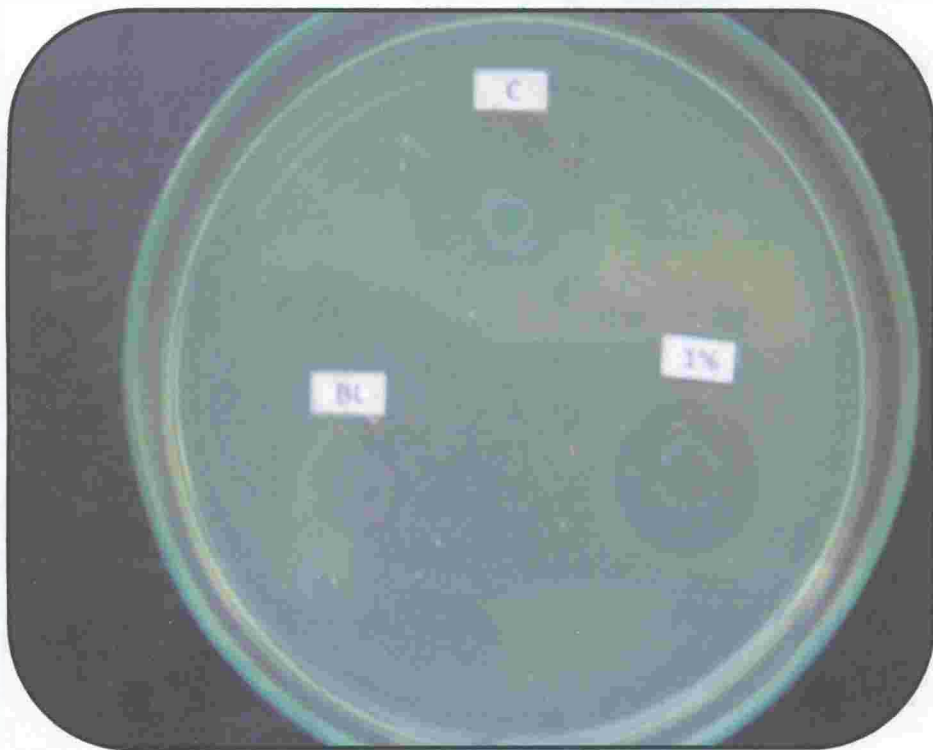
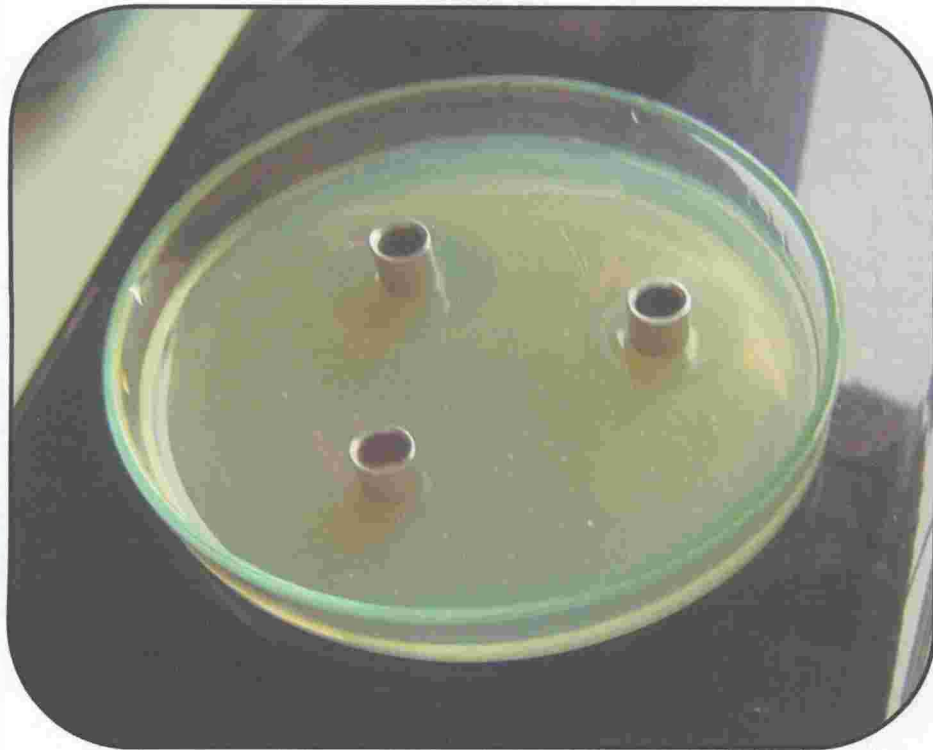


Figura 10. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 1% con su respectivo control y blanco

Anexo 06

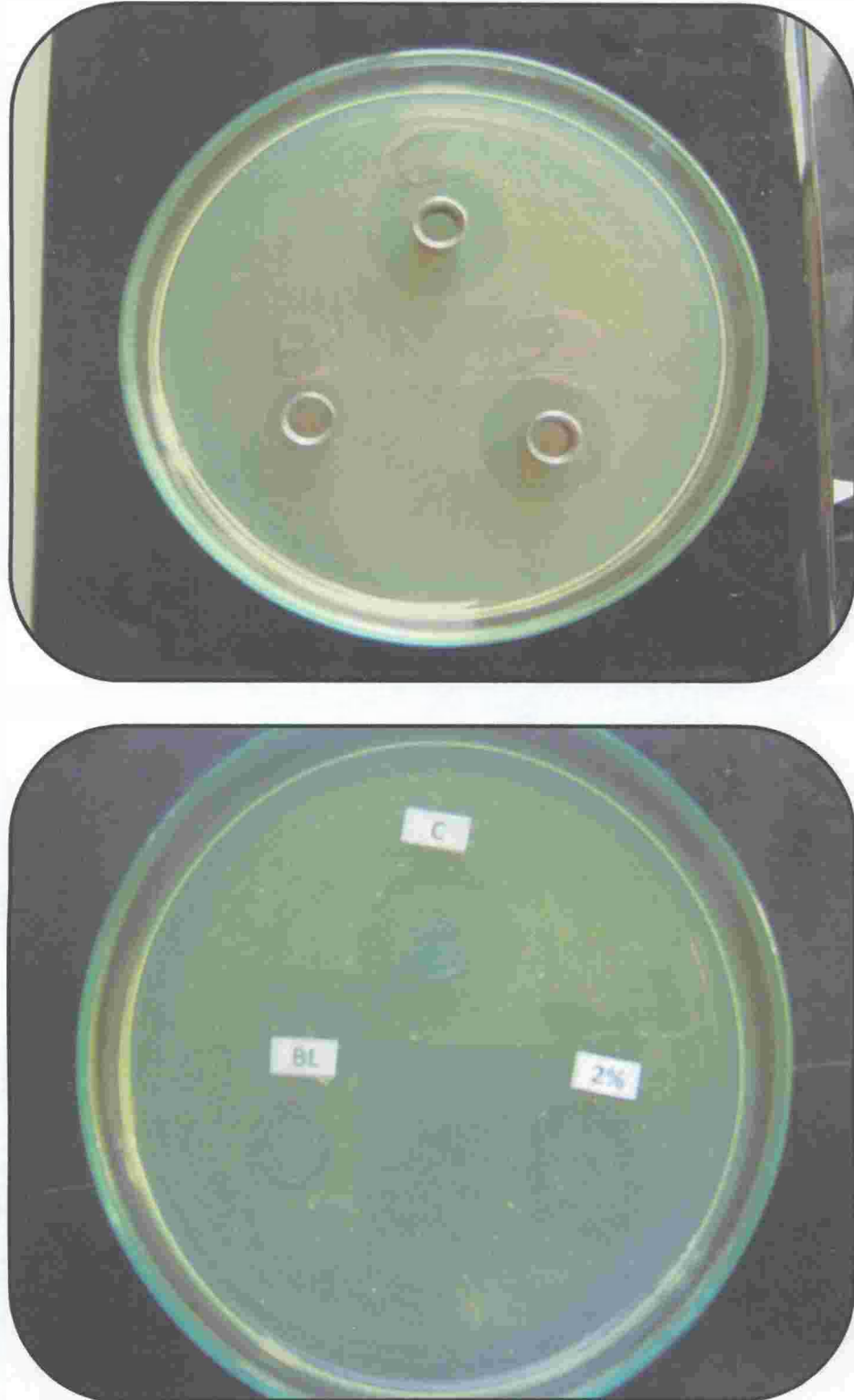


Figura 11. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 2% con su respectivo control y blanco



Anexo 07

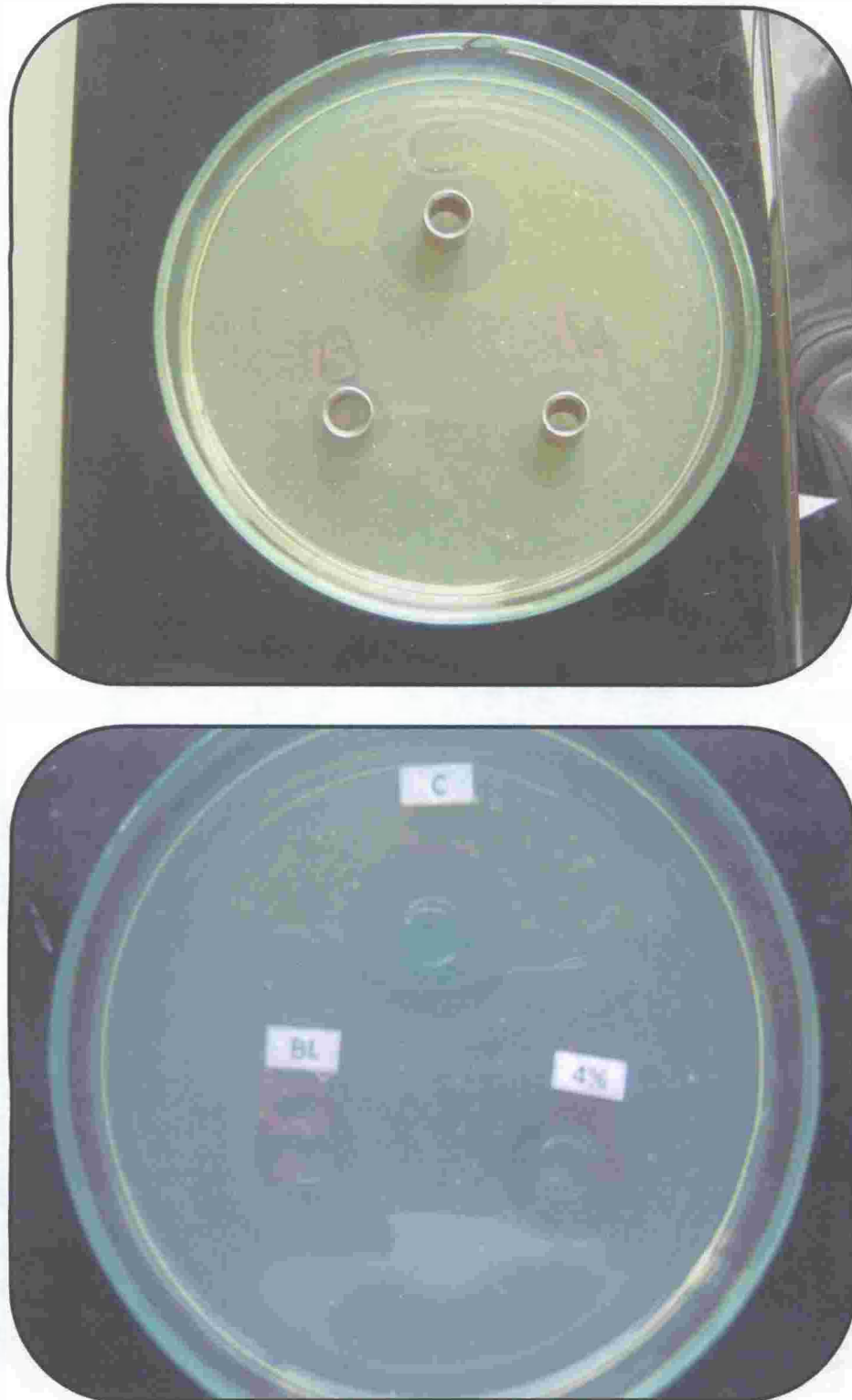


Figura 12. Halo de inhibición de un enjuague bucal de propóleo al 4% con su respectivo control y blanco

# ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN ENJUAGUE BUCAL FORMULADO A BASE DE EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO DE *Apis mellifera* “ABEJA”. AYACUCHO, 2012

Ingrid Maribel, Cárdenas Paredes<sup>1</sup>, Edgard Cárdenas Landeo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Farmacia y Bioquímica: UNSCH

## RESUMEN

Las caries dentales son un problema de alta incidencia a nivel mundial relacionada con la existencia de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral; es así que el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de un enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo (EBEE) de *Apis mellifera* “abeja” de la provincia de Huanta; utilizando el método de incorporación con cilindros calibrados, enfrentado los EBEEP al 0,5%, 1%, 2% y 4%, a cepas de *S. mutans* ATCC 25175, comparándose con un control (clorhexidina 0,12%) y un blanco (enjuague bucal sin principio activo), mediante la medición de los halos de inhibición. El estudio se enmarcó dentro de un diseño de investigación aplicada experimental, el análisis estadístico se realizó mediante las pruebas de ANVA y Tukey (SPSS 20). La investigación fue desarrollada en los Laboratorios de Farmacia y Bioquímica de la UNSCH y el Laboratorio Microbiol S.A. Se determinó que la actividad antibacteriana del EBEEP contra *Streptococcus mutans* muestra una tendencia directamente proporcional a la concentración 0,5%, 1%, 2% y 4%, en el diámetro de los halos formados; presentando mayor eficacia el EBEEP al 4% con una media de 21,53 mm  $\pm$  0,48 mm y se encontró que las cuatro concentraciones luego de las 48 no presentan una diferencia significativa con las concentraciones adyacentes ( $P > 0,05$ ), sin embargo todas presentan una diferencia significativa frente al control (con clorhexidina) y al blanco ( $P < 0,05$ ). Por otro lado se determinó que el EBEEP al 4% presentó un mayor porcentaje de inhibición con una media 96,40  $\pm$  1,19, siendo este valor significativamente diferente a las otras concentraciones pero similar al obtenido con el control ( $P < 0,05$ ). Llegando a concluir que el EBEEP al 4% tuvo mayor efecto antibacteriano frente a las otras concentraciones; no llegando a superar a los efectos del control pero si obteniendo similares resultados al determinar su porcentaje de inhibición.

Palabras clave: Propóleo, *Streptococcus mutans*, Actividad antibacteriana

## SUMMARY

*Streptococcus mutans* is a bacterium that is associated with dental decay, a problem abundant in the world population. Propolis is a resinous compound and sticky, produced by *Apis mellifera*, most notably its antibacterial properties. The target of this study was to evaluate the antibacterial activity of ethanol extract mouthwash propolis of *Apis mellifera* "Bee" of Huanta (EEMP); using the method of incorporation with metering rods, faced the EBEEP 0.5 %, 1%, 2% and 4%, strains of *S. mutans* ATCC 25175, comparing with a control (chlorhexidine 0.12%) and white (no active mouthwash), by measuring the inhibition halos. The study was framed within an experimental applied research design; statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey (SPSS 20). The research was developed in the of Pharmacy and Biochemistry of the UNSCH and Microbiol Laboratory S.A. Found that the antibacterial activity of EEMP against *Streptococcus mutans* shows a tendency directly proportional to its concentration 0.5%, 1%, 2% and 4%, the diameter of the haloes formed, presenting more effectively EEMP 4% with a mean of 21.53 mm  $\pm$  0.48 mm and found that the four concentrations after 48 does not show a significant difference with adjacent concentrations ( $P > 0.05$ ), no clutch all show a significant difference from control (chlorhexidine) and white ( $P < 0.05$ ). On the other side EEMP determined that 4% showed a higher percentage of inhibition with an average 96.40  $\pm$  1.19, this value being significantly different from the other concentrations but similar to that obtained with the control ( $P < 0.05$ ). Coming to the conclusion that EEMP 4% had more antibacterial effect against other concentrations, not even higher than control purposes but if getting similar results to determine the percent inhibition.

Keywords: Propolis, *Streptococcus mutans*, antibacterial activity



## INTRODUCCIÓN

La incidencia de las enfermedades infecciosas y su consecuente costo en vidas y recursos económicos en las últimas décadas ha hecho que su prevención sea una de las principales preocupaciones de las entidades encargadas de atención en salud a nivel mundial; en lo que concierne a la salud oral, la prevalencia de caries son de particular importancia, presentándose mayor tendencia de la enfermedad en los países en vías de desarrollo, colocando al Perú entre los países latinoamericanos con mayores niveles de la caries dental.<sup>1,2</sup> La cavidad oral alberga innumerables microorganismos en un ecosistema de complejidad considerable, constituyendo la flora bucal del ser humano como altamente diversa. Estos microorganismos son parte importante en la salud y las enfermedades orales; por lo tanto es de vital importancia buscar formas farmacéuticas que contengan nuevas sustancias para ayudar a controlar la proliferación de estos agentes patógenos.<sup>1</sup>

Debido al uso indiscriminado y prolongado de antimicrobianos artificiales se ha elevado el número de patógenos mutantes resistentes, tomando fuerza el uso de antimicrobianos naturales como una alternativa eficaz y económica en el tratamiento de infecciones bacterianas, siendo los apifármacos como el propóleo ejemplo fehaciente de esto.<sup>3</sup> Sin embargo muchas indicaciones del propóleo se apoyan en resultados empíricos que necesitan ser comprobados científicamente mediante nuevas observaciones y estudios clínicos sistematizados.<sup>4</sup> La medicina natural y tradicional es un sistema emanado de los pueblos y por consiguiente, bien aceptado como parte de sus culturas, actualmente tiene 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.<sup>3</sup> Además, en la actualidad se reconoce la importancia de los compuestos de origen natural porque poseen innumerables características, son de bajo costo y sus principios activos están biológicamente equilibrados evitando que se acumulen en el organismo, no presentando efectos secundarios o colaterales.<sup>5</sup>

En estos últimos años, se ha puesto especial atención a las indicaciones médicas del propóleo por poseer diferentes propiedades atribuidas a la gran variedad de compuestos químicos que posee, su composición no es estable y varía según la procedencia.<sup>6</sup> Así mismo destaca entre sus propiedades a la actividad antibacteriana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides.<sup>7</sup> Cabe mencionar que el Perú tiene una gran biodiversidad en flora, la cual favorece el desarrollo de apicultura especialmente en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, esto reforzado con el desarrollo de la farmacéutica y tratamientos fitoterápicos, ha permitido considerar a los

enjuagues bucales como una alternativa de tratamiento por ser una formulación líquida muy útil, por que actúan como un medio ideal para la medicación de la cavidad oral.<sup>8</sup>

En el presente estudio se investigó la actividad antibacteriana de unos enjuagues bucales elaborados a base de extracto etanólico de propóleo de *Apis mellifera* “abeja”, de la provincia de Huanta departamento de Ayacucho, enfrentado a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, un microorganismo de la cavidad oral.

Los objetivos específicos planteados fueron:

- Evaluar las características de los enjuagues bucales elaborados con extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones.
- Determinar y comparar la actividad antibacteriana de los enjuagues bucales elaborados sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar y comparar el porcentaje de inhibición de los enjuagues bucales elaborados sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar la concentración de enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo que tiene similar actividad antibacteriana que el enjuague bucal con clorhexidina al 0,12% (control) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Población.-** La población del estudio comprende al Propóleo (propóleo de *Apis mellifera* “abeja”) de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

**Muestra.-** La muestra está constituida por Un kg de propóleo (propóleo de *Apis mellifera* “abeja”), recolectado de 28 panales de abeja en el mes de octubre del 2012, en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

**Unidad muestral.-** La unidad muestra esta compuesta por Cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, adquiridas por el Laboratorio Microbiol S.A. de ATCC®.

### Tamaño de muestra

Tomando en consideración que no se conocía con precisión el tamaño de la población, se determinó el tamaño muestral con la siguiente formula:<sup>9</sup>

$$n = \frac{Z^2 pq}{B^2} = \frac{1,96^2 \times 0,5 \times 0,5}{0,05^2} = 384,15$$

Donde n= Tamaño de la muestra, z= 1,96 para el 95% de confianza, p=Frecuencia esperada del factor a estudiar, q= 1- p, B= Precisión o error admitido.<sup>9</sup>

El valor de n obtenido por esta fórmula indica el tamaño de la muestra para una población infinita, considerando que en el presente trabajo de investigación se dispone de una población pequeña (de propóleo de las colmenas ubicadas en el distrito de Luricocba), se aplica la siguiente fórmula:<sup>9</sup>

$$\frac{1}{n'} = \frac{1}{n} + \frac{1}{N} = \frac{1}{384,16} + \frac{1}{30} = 28$$

Donde n'= Tamaño de la muestra necesario, n= Tamaño de la muestra según la primera fórmula y N= Tamaño de la población con la que se cuenta<sup>9</sup>

$$\frac{1}{n'} = \frac{1}{n} + \frac{1}{N} = \frac{1}{384,16} + \frac{1}{30} = 28$$

Según lo calculado se realizó un muestreo aleatorio de 28 colmenas de *Apis mellifera* "abeja" ubicadas en el distrito de Luricocba de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, recolectando 1000g de propóleo.<sup>9</sup>

#### Diseño metodológico

Tipo de investigación.- Aplicada<sup>10</sup>

Alcance de investigación.- Explicativo<sup>10</sup>

Diseño de investigación.- Transeccional<sup>10</sup>.

#### Procedimiento experimental

##### Recolección de la muestra

El propóleo fue recolectado de las colmenas de la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho, entre los meses de setiembre y octubre, con la ayuda de un especialista con experiencia en la recolección de este recurso natural. Se recolectó un aproximado de 1000 g y se procedió a envasarlo en frascos de vidrio ámbar estériles para su transporte. El propóleo se recolectó bajo las condiciones higiénicas necesarias que impidieron la contaminación.

##### Caracterización del propóleo según la norma de calidad internacional rusa rst rsfr 317-77

Se compararon las características del propóleo recolectado en la provincia de Huanta departamento de Ayacucho con los parámetros establecidos por la Norma de Calidad Internacional Rusa RST RSFR 317-77 donde define los parámetros que debe cumplir el propóleo.

##### Obtención del extracto de propóleo

El extracto de propóleo se obtuvo siguiendo la metodología de Mayta y Sacsquispe, Rodríguez y Navarro.<sup>7, 11,12</sup>

- En el laboratorio se eliminaron las impurezas que no formen parte de ella (restos de madera, de hojas, ceras, restos de abejas y otros).
- Se congeló la masa de propóleo a temperatura de -20 a -30°C por 48 horas.
- Se procedió a pulverizar la masa de propóleo con ayuda de un sistema mecánico.
- La extracción se realizó con solución etanólica (etanol al 80%), en una proporción de 40g de propóleo en 100ml de la solución etanólica
- Se procedió a macerar por 5 días, agitando diariamente por 30 minutos.
- Luego se filtró el extracto, con el uso de un papel filtro, separando el filtrado y del sólido residual.
- El extracto obtenido del filtrado se sometió a baño maria a 37°C hasta la evaporación y desaparición del solvente, quedando como residuo el extracto semifluido.
- Se obtuvo un extracto semifluido de concentración 28%.
- Se envasó el extracto en frasco estéril color ámbar, el cual se conservó en un lugar fresco y seco alejado de la luz.
- A partir del extracto de propóleo obtenido, se formularon enjuagues bucales a diferentes concentraciones 4%, 2%, 1% y 0,5%.

##### Elaboración de un enjuague bucal

Los enjuagues bucales se elaboraron siguiendo la metodología de Rodríguez y Mamani.<sup>11,13</sup>

- Se elaboraron 5 formulaciones: 4 con diferentes concentraciones (4%, 2%, 1% y 0,5%) y un control, según Anexo 16.
- En un vaso precipitado (01) se midió 10 ml. de agua hervida caliente y se agregó la Sacarina sódica, agitando con una varilla constantemente.
- En un segundo vaso precipitado (02) se midió 10 ml. de agua hervida y se dejó enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se le agregó polisorbato 20.
- Se procedió a calentar la solución del vaso precipitado (02) hasta 40°C y se le agregó el extracto semifluido de propóleo, propilparabeno, metilparabeno y propilenglicol, se mezcló constantemente por 5 minutos.
- Se mezcló el vaso precipitado (01) con el vaso precipitado (02) obtenido anteriormente durante 10 minutos.
- En un vaso precipitado (03) conteniendo 10 ml de agua hervida a 60°C, se añadió lentamente el sorbitol y la glicerina, hasta obtener una mezcla homogénea. Luego se adicionó esta solución a la anteriormente obtenida, agitando con una varilla por un tiempo de 30 minutos.

- Se dejó enfriar y se filtró para obtener una solución translúcida.

### Identificación cualitativa de los fenoles

Se identificó de manera cualitativa los principales metabolitos contenidos en el propóleo, los flavonoides mediante la reacción de Shinoda y los fenoles mediante la reacción con cloruro férrico.

### Evaluación de las características fisicoquímicas

Se evaluaron las características organolépticas del enjuague bucal tomando en cuenta el color, olor, sabor, homogeneidad y pH.

### Prueba de actividad antibacteriana

#### Preparación del inóculo

- Una vez adquiridas las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, éstas fueron reactivadas incubándolas en caldo Casoy más lactosa a 37°C por 48 horas.<sup>14,15</sup>
- El día de la prueba se preparó el inóculo en solución salina al 0,85%, obteniendo una suspensión bacteriana con una turbidez aproximada a 0,5 en la escala de Mc Farland.<sup>14,15</sup>

#### Preparación de las placas de ensayo

- Se preparó 13 placas cada una con 21 ml de agar Antibiótico N° 11 como base y 4 ml de agar Antibiótico N° 1 inoculado con la suspensión bacteriana en una proporción de 1ml por cada 100ml de agar.
- Una vez solidificada la segunda capa de agar se separaron 12 placas y con ayuda de una pinza estéril se colocaron los cilindros de acero inoxidable en 3 regiones de equidistantes de la placa (una distancia no menor de 15 mm entre si y a 1,5 cm del borde de la placa). Las dimensiones del cilindro de acero inoxidable es el siguiente: Diámetro interno 6 mm +1 mm, diámetro externo 8mm + 1mm y longitud de 10mm + 1mm.
- Adicionalmente se utilizó un control negativo del medio sin inocular.

#### Enfrentamiento

- Por cada concentración de enjuague bucal se utilizaron tres placas inoculadas y en cada cilindro se añadió 200 ul de las soluciones de prueba (blanco, control y muestra).
- Las placas se llevaron a incubación a 37°C durante 48 horas.
- Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la medición de los halos de inhibición, utilizando un vernier digital calibrado.

Tabla 01. Distribución de los enjuagues bucales por cada placa inoculada con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

N° Placa Petri	Clorhexidina al 0,12% control	Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"				Enjuague bucal base Blanco
		4%	2%	1%	0.50%	
Placa 01						
Placa 02	x	x				x
Placa 03						
Placa 04						
Placa 05	x		x			x
Placa 06						
Placa 07						
Placa 08	x			x		x
Placa 09						
Placa 10						
Placa 11	x				x	x
Placa 12						

#### 1.1. Recolección de datos

El proceso de recolección de datos se realizó de manera manual mediante la aplicación en una tabla de recolección de datos, donde se registró la sensibilidad de la bacteria a los enjuagues bucales y el tamaño del halo de inhibición. La tabulación de los datos se realizó en una computadora.

#### 1.2. Análisis de datos

Se determinó el diámetro del halo de inhibición de cada uno de los tratamientos, se calculó la media, la desviación estándar, las diferencias entre el tratamientos se evaluaron mediante la prueba de Análisis de Varianza y la prueba complementaria de Tukey con un 95% de confianza ( $\alpha=0,05$ ), utilizando el programa SPSS 20.

Así mismo, se calculó el porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro del halo de control}} \cdot 100$$

## RESULTADOS

Tabla 02. Características organolépticas y especificaciones del propóleo de *Apis mellifera* "abeja".

Características	Especificaciones	Resultados
Aspecto externo	Pequeños granos o briquetas	Cumple
Color	Verde oscuro, pardo o gris con matices verde, amarillo, castaño oscuro o rojo.	Cumple
Olor	Característico, resinoso, aromático (la mezcla de olores de la miel) de las hierbas aromáticas.	Cumple
Sabor	Amargo, aligofuente	Cumple
Estructura	Es pesa con deformaciones heterogéneas	Cumple
Consistencia	De 20 a 40° C es viscoso a menos de 20° C es dura.	Cumple
Cera	No más del 30 %	Cumple
Reacción cualitativa ante los compuestos flavonoides.	Positiva	Cumple

Tabla 03. Características organolépticas de cuatro enjuagues bucales de propóleo.

Características	Enjuague bucal con 0,5%	Enjuague bucal con 1%	Enjuague bucal con 2%	Enjuague bucal con 4%	Control	Blanco
Aspecto	Líquido translúcido	Líquido translúcido	Líquido translúcido	Líquido translúcido	Líquido translúcido	Líquido translúcido
Color	Amarillo claro translúcido	Amarillo claro translúcido	Amarillo translúcido	Amarillo translúcido	Bianco translúcido	Amarillo translúcido
Olor	Sui generis	Sui generis	Sui generis	Sui generis	Sin olor	Sui generis
Sabor	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo	Ligeramente amargo
pH	5,1	5,8	6,5	6,8	5,7	6,8

Tabla 04. Presencia de los halos de inhibición de los enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Halos de inhibición		Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"					
		Control	0,5%	1%	2%	4%	Blanco
PLACA 01	SI	X	X				X
	NO						
PLACA 02	SI	X	X				X
	NO						
PLACA 03	SI	X	X				X
	NO						
PLACA 04	SI	X		X			X
	NO						
PLACA 05	SI	X		X			X
	NO						
PLACA 06	SI	X		X			X
	NO						
PLACA 07	SI	X			X		X
	NO						
PLACA 08	SI	X			X		X
	NO						
PLACA 09	SI	X			X		X
	NO						
PLACA 10	SI	X				X	X
	NO						
PLACA 11	SI	X				X	X
	NO						
PLACA 12	SI	X				X	X
	NO						

Tabla 05. Análisis estadístico de los diámetros de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Valores estadísticos	Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"					
	Clorhexidina al 0,12%	0,5%	1%	2%	4%	Blanco
Media	24,15	19,14	19,79	21,18	21,53	14,05
Desviación estándar	1,17	0,15	0,37	0,67	0,48	0,47
Mínimo	22,08	18,98	19,44	20,62	21,00	13,42
Máximo	25,27	19,27	20,17	21,92	21,92	14,93

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo

Tabla 06. ANVA y prueba de Tukey De los diámetros de los halos de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

N	Media	ANVA	Prueba de Tukey					Control
			Blanco	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%	
Blanco	12	14,06		P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*
0,5%	3	19,14	P=0,000*			P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*
1,0%	3	19,79	0,000**	P=0,000*		P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*
2,0%	3	21,18	P=0,000*	P=0,000*				P=0,000*
4,0%	3	21,54	P=0,000*	P=0,000*				P=0,000*
Control	12	24,15	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	P=0,000*	

\*\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas (ANVA)

\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas (Comparaciones pareadas prueba de Tukey)

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo

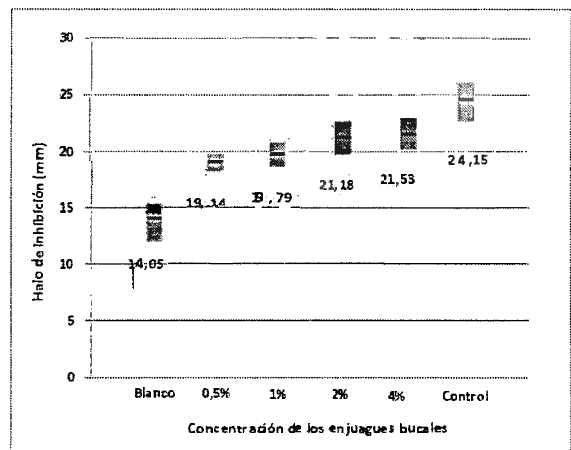


Figura 01. Variación de los halos de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

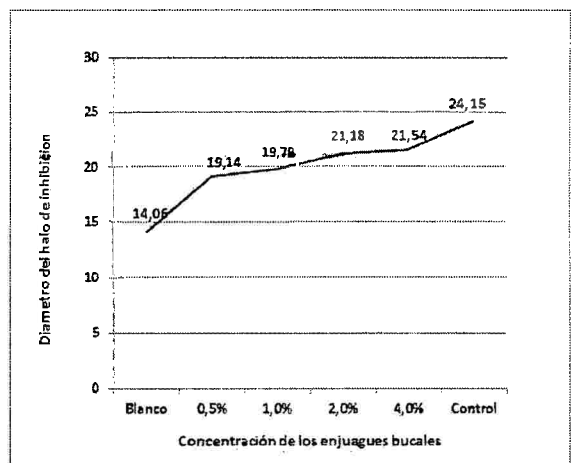


Figura 02. Tendencia del diámetro promedio del halo de inhibición según concentración de enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Tabla 07. Análisis estadístico del porcentaje de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Valores estadísticos	Clorhexidina al 0,12%	Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo de <i>Apis mellifera</i> "abeja"				Enjuague bucal base
	control	0,50%	1%	2%	4%	Blanco
Media	100	76,72	78,83	87,51	96,40	58,34
Desviación estándar	0	0,94	1,40	2,81	1,19	0,47
Mínimo	100	75,77	77,23	84,44	95,11	53,34
Máximo	100	77,64	79,82	89,95	97,47	63,65

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo

Tabla 08. ANVA y prueba de Tukey del porcentaje de inhibición de cuatro enjuagues bucales de propóleo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

N	Media	ANVA	Prueba de Tukey					
			Blanco	0,5%	1,0%	2,0%	4,0%	Control
12	58,34			P=0,00*	P=0,00*	P=0,00*	P=0,00*	P=0,00*
3	76,72		P=0,00*		P=0,00*	P=0,00*	P=0,00*	
3	78,83	0,000**	P=0,00*		P=0,01*	P=0,00*	P=0,00*	
3	87,51		P=0,00*	P=0,00*	P=0,01*		P=0,01*	P=0,00*
3	96,40		P=0,00*	P=0,00*	P=0,00*	P=0,01*		
12	100		P=0,00*	P=0,00*	P=0,00*	P=0,00*		

\*\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas (ANVA).

\*P=0,00 ó <0,05 existe diferencias significativas

(Comparaciones pareadas prueba de Tukey)

EBEEP= Enjuague bucal de extracto etanólico de propóleo

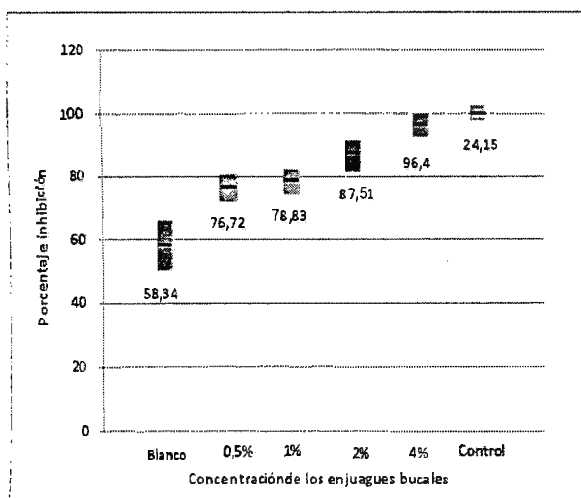


Figura 03. Porcentaje de inhibición según concentración de enjuague de los enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

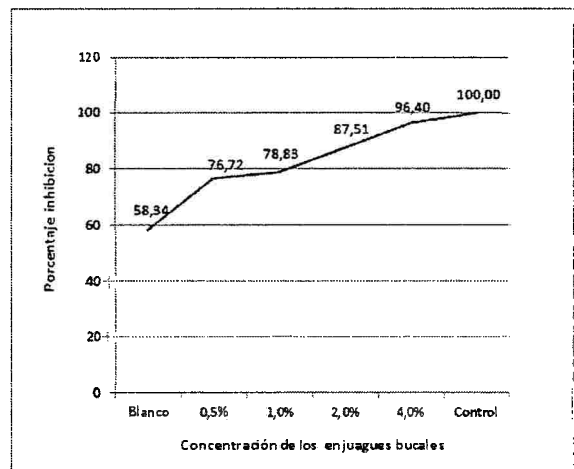


Figura 04. Tendencia del porcentaje de inhibición promedio según concentración de enjuagues bucales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## DISCUSIÓN

Se buscó evaluar si los enjuagues bucales elaborados a base de extracto etanólico de propóleo a concentraciones de 0,5%, 1%, 2% y 4% poseen actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, comparándola con un enjuague bucal con clorhexidina al 0,12% normalmente utilizado.

Se observó que las características organolépticas del propóleo proveniente de la provincia de Huanta departamento de Ayacucho cumplió con las especificaciones señaladas en la Norma de Calidad Rusa RST RSFR 317-77 (Tabla 03). Así mismo queda confirmado que el propóleo es una mezcla compleja que contiene principalmente fenoles y que su composición y características dependen del origen de la muestra, considerando hasta 160 posibles compuestos fenólicos con actividad farmacológica<sup>6</sup>; también se comprobó que los flavonoides son el principal compuesto fenólicos del propóleo y están asociadas a sus propiedades místicas<sup>16</sup>; que la composición y las características organolépticas están ligada principalmente a la flora del área ecológica<sup>17,18</sup>, sin embargo, existen sustancias que se encuentran en el propóleo de modo constante y relativamente estable; entre los cuales se puede mencionar a los fenoles, sustancias responsables del efecto antibacteriano de cualquier variedad de propóleo.

Los enjuagues bucales elaborados presentaron características organolépticas que le asignan sus excipientes y su principio activo (Tabla 04), resultando ser un medio ideal para la incorporación de un principio activo antibacteriano como el propóleo; de lo anteriormente mencionado se destacan a las investigaciones donde se incorporaron aceites esenciales en la formulación de su enjuague bucal para demostrar la actividad

antibacteriana;<sup>19,13</sup> así mismo, cabe mencionar la existencia de estudios sobre preparados para la higiene bucal, utilizados para determinar el efecto antibacteriano de microorganismos de la cavidad oral, otros autores plantearon la elaboración de un gel dental de propóleo evaluando el efecto antibacteriano del mismo frente a cepas de *Streptococcus mutans*.<sup>20</sup>

Se obtuvo que todos los enjuagues bucales elaborados poseen actividad antibacteriana evidenciada por la presencia de los halos de inhibición (Tabla 05), atribuyendo dicho efecto al propóleo, con lo cual verifico los estudios de las propiedades antibacterianas del extracto etanólico de propóleo mas no así de enjuagues bucales elaborados a base de propóleo,<sup>21,22</sup> siendo está una limitante; también se mencionó que los enjuagues bucales son formulaciones líquidas que pueden poseer efecto antibacteriano, empleándose típicamente como agente antibacteriano a los fenoles, compuesto que se encuentra en el propóleo.<sup>8</sup>

Por otra parte los diámetro de los halos de inhibición obtenidos (Tabla 06) permiten apreciar que el enjuague bucal base (solo excipientes) presenta un halo de inhibición bacteriana, significativamente menor en tamaño que los EBEEP al 0,5%, 1%, 2%, 4%, y el control ( $P < 0,05$ ), atribuyendo dicho efecto principalmente a los parabenos, compuesto químico utilizado habitualmente en las industrias cosmética y que actúan de manera efectiva como conservantes teniendo además propiedades bactericidas;<sup>23</sup> considerando al blanco como patrón de comparación en la presente investigación; asimismo el EBEEP al 4% posee un mayor tamaño de halo de inhibición bacteriana que las otras concentraciones pero menor que el control y el EBEEP al 0,5% solo supera en tamaño al blanco. De lo antes mencionado surgió el propósito del estudio, el cual fue demostrar la actividad antibacteriana de enjuagues bucales elaborados a base de extracto etanólico (EBEEP), frente a cepas de *S. mutans*; logrando demostrar que existen diferencias significativas con respecto al tamaño de los halos de inhibición en las distintas concentraciones de enjuagues bucales de extracto etanólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" (0,5%, 1%, 2%, 4%).

Por lo antes mencionado se realizó un análisis estadístico de los diámetros obtenidos (Tabla 07), considerando que según en el análisis ANVA al menos uno de las concentraciones del EBEEP es significativamente diferente al blanco, al control o a las otras concentraciones de EBEEP. Asimismo según el análisis Tukey se demostró que a pesar de existir una relación directamente proporcional entre el tamaño de los halos y las concentraciones, el EBEEP al 4% es significativamente mayor frente al EBEEP al 0,5% y 1% ( $P < 0,05$ ) pero

significativamente igual al EBEEP al 2% ( $P > 0,05$ ) y el EBEEP al 2% es significativamente mayor frente al EBEEP al 0,5% ( $P < 0,05$ ) pero significativamente igual al EBEEP al 4% y 1% ( $P > 0,05$ ); también se encontró que EBEEP al 1% es significativamente igual al EBEEP al 2% y 0,5%; considerando también al EBEEP al 0,5% como significativamente igual al EBEEP al 1% ( $P > 0,05$ ); lo cual coincide con investigaciones que demostraron que a mayor concentración el tamaño del halo es mayor, no existiendo a pesar de ello una diferencia significativa entre las concentraciones contiguas.<sup>7</sup>

Por otra parte se pudo demostrar que el porcentaje de inhibición bacteriana obtenido (Tabla 08) es de un 100% para el enjuague con clorhexidina al 0,12% (control), encontrándose al EBEEP al 4% con una concentración muy cercana a la ideal por tener con un valor promedio de 96,40+1,19%. Realizando el respectivo análisis estadístico a los porcentajes de inhibición (Tabla 09) se confirmó con ANVA que al menos uno de los grupos presenta un porcentaje de inhibición significativamente diferente, definiendo con el análisis de Tukey que el EBEEP al 4% tiene un porcentaje de inhibición bacteriana significativamente mayor frente al EBEEP al 0,5%, 1% y 2% ( $P < 0,05$ ) pero significativamente igual al Control ( $P > 0,05$ ) Los estudios realizados por Mayta y Sacsquispe<sup>7</sup> y Dantas y col.<sup>24</sup> demuestran que la actividad antibacteriana del propóleo en comparación a la clorhexidina al 0,12% no supera su efecto, coincidiendo con lo obtenido en la presente investigación cuyo porcentaje de inhibición resultante es semejante entre el EBEEP al 4% y el enjuague bucal que contiene clorhexidina al 0,12% no llegando a superar el efecto de esta último.

Analizando los resultados obtenidos en el presente estudio se puede compararlas las concentraciones de EBEEP al 0,5%, 1%, 2% y 4% con concentraciones similares utilizadas en otros estudios<sup>25</sup> sobre la actividad antibacteriana de la solución hidroalcohólica de propóleo al 4% frente a cepas de microorganismos de la cavidad oral como los *Streptococcus*; investigaciones comparativas sobre la actividad antibacteriana del extracto de propóleo al 0,37%, usado sobre bacterianas orales comunes entre ellas el *Streptococcus mutans*<sup>26</sup> y un estudio en 50 escolares con antecedentes de alta infección por *Streptococcus mutans*, quien verificó la actividad anticaries de una crema dental que contiene 0,8 g de extracto de propóleo;<sup>27</sup> demostrándose en los tres casos una actividad antibacteriana considerable.

Por todo lo anteriormente mencionado es posible justificar su acción antibacteriana en estudios que mencionan un posible efecto de los flavonoides frente a microorganismo orales, por la inhibición de la enzima glucosiltransferasa evitando la formación

de glucanos, demostrando in vitro la actividad antibacteriana frente *Streptococcus mutans*<sup>28</sup> Otros autores observaron que la acción antibacteriana del propóleo utilizaba varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, evitando la división celular, desorganizado el citoplasma, la membrana citoplasmática, y la pared celular, causando una bacteriolisis parcial, e inhibiendo la síntesis de proteína<sup>29</sup>.

De esta manera, al contrastarse los resultados obtenidos por los autores mencionados con los del presente trabajo de investigación se establece la acción antibacteriana de los EBEEP al 4%, 2%, 1% y 0,5%, lo que confirma la hipótesis, encontrándose diferencias y similitudes significativas ya mencionadas, entre las concentraciones que puede asociarse también al método aplicado en el presente estudio (cilindro en placa) así como los medios utilizados (agar antibiótico N° 11 y N°01) que permitieron obtener resultados más claros. Por lo antes expuesto el presente estudio sirve como base para que posteriormente se continúe ampliando los conocimientos sobre el propóleo y su uso potencial como antibacteriano en diferentes formulaciones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Madrid M, Castro A, Echeandía J, Chein S, et al. Modelo de atención integral de salud en Pachacútec. Revista científica Odeontología Sanmarquina. [Revista en línea] 2011 [Consultado julio 2012]; 14 (1) Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011\\_n1/pdf/a03.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2011_n1/pdf/a03.pdf)
- Ministerio de Salud. Plan de Salud Bucal. Dirección General de Salud de las Personas. [monografía en Internet]. Perú: MINSA; 2012. [consultado julio 2012]. Disponible en: [http://www.minsa.gob.pe/portada/est\\_san/saludbucal.htm](http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm)
- Bravo A, Díaz L, Armas L. Tratamiento de la alveolitis dental con tintura de propóleos al 5 %. Revista Cubana de Farmacia. [Revista en línea] 2012. [consultado julio 2012]; 46 (1). Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034152012000100012&script=scartext&tlng=pt>.
- Baumgarten P. Actividad antimicrobiana de extractos y tintura propóleo en cepas de *Streptococcus mutans*. Revista Investigación Científica del Instituto de Investigaciones Odontológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas. [Revista en línea] 2006 [Consultado julio 2012]; 3(2). Disponible en: <http://www.uaz.edu.mx/cippublicaciones/ricvol3num2especial/Ciencias%20de%20la%20Salud/Actividad%20antimicrobiana%20-%20Paloma%20Baumgarten.pdf>
- Samara N, Benítez N, Cabezas F. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. Artículos de Investigación Científica y Tecnológica del Departamento de Biología de la Universidad de Cauca. [Revista en línea] 2011 [consultado julio 2012]; 1(1). Disponible en: <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol9-1/ACTIVIDAD%20ANTIBACTERIANA%20Y%20COMPOSICION%20CUALITATIVA%20DE%20PROPOLEOS.pdf>
- Banova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences [Revista en línea] 2005 [consultado julio 2012]; 100(1-2). Disponible en: <http://lib.bioinf.pl/pmid:15993016>
- Mayta F, Sacsquispe S. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa- Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* [Tesis pregrado]. Lima: Facultad de Estomatología Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2009.
- Santa María H. Dermofarmacia Manual de prácticas. 2a ed. Lima-Perú: Editorial Sanmarquina; 2008.
- Enrie M, Jordi C. Tamaño de la muestra. Universitat Autònoma de Barcelona, Rev. Epidem. Med. Prev. Barcelona, España. [revista en línea] 2003 [consultado julio 2012]; 1: 8-14p. Disponible en: <http://www.epidemiology.com/epidemiology/img/datos/2106582TamanoMuestra3.pdf>
- Hilario P. Criterios operativos para hacer La Tesis. 2ª ed. Ayacucho: [s.n.], 2000.
- Rodríguez MA. Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar [Tesis pregrado]. Lima: Facultad de Odontología UNMSM; 2012.
- Navarro A. Actividad fotoprotectora de crema elaborada a base de extracto hidroalcohólico de propóleo de *Apis mellifera* "abeja" en ratas albinas Holtzman [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas; 2011.
- Mamani JR. Actividad antibacteriana del enjuague bucal formulado a base de aceite esencial de hojas de *Aloysia triphylla* "cedrón" frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis pregrado]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas; 2011.
- Alvarado V. Plantas medicinales: efecto antibacteriano in vitro de *Plantago major* L., *Erithroxylum novogranatense*, *Plowman var truxillense* y *Camelia sinensis* sobre bacterias de importancia estomatológica. Revista científica odontología Sanmarquina. [revista en línea] 2010 [consultado agosto 2012]; 13(2): 21-25p. Disponible en: [http://www.odontologia-unmsm.edu.pe/revista\\_cientifica\\_odontologica\\_2010\\_II.pdf#page=22](http://www.odontologia-unmsm.edu.pe/revista_cientifica_odontologica_2010_II.pdf#page=22)
- USP 35. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario nacional [CD-ROM]. Estados Unidos de América; 2012.

16. Bruschi L, Lara H, Martins H, Vinholis H, Casemiro A, Panzeri H, Gremião P. Preparación y actividad antimicrobiana de macropartículas de gelatina que contienen propóleo contra patógenos orales. *Drug Development and Industrial Pharmacy of Brasil: Facultad de Odontología de Ribeirão Preto*. [revista en línea] 2006 [consultado Agosto 2012]; 32(2):229-238. Disponible en: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/03639040500466312>.
17. Gómez A, Gómez M, Arrez D, Segura A, Fernández A. Advance in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. [revista en línea] 2006 [consultado julio 2012]; 41(1): 1220–1234p. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621403>.
18. Cassina CN, Oliva AL, Cuesta OL, De Simone M. Propiedades antibacterianas de propóleo cubanos. *Universidad Nacional de Rio Cuarto. Cuba*. [serie de internet] 2006 [acceso Agosto 2012]; 1(1): 1p. Disponible en: [http://www.silae.it/docs/atti\\_xv\\_congresso.pdf](http://www.silae.it/docs/atti_xv_congresso.pdf).
19. Rodríguez D. Proceso y conceptos de las enfermedades más prevalentes en Estomatología. *Estomatología preventiva y Servicio a la comunidad 1 Lima-Perú*. [Clase Magistral] 2005. [consultado Agosto 2012]. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/2387063/Clase-3-Enf-mas-prevalentes-Caries-Denta>.
20. Ayala C. Desarrollo de un gel dental de propóleo y su efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Streptococcus mutans*. [Tesis pregrado]. Trujillo: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNT; 2010.
21. Fajuri M, Huertas J, Silva N. Eficacia del propóleo chileno como antimicrobiano contra microorganismos de interés en Odontología. [Tesis pregrado]. Chile: Facultad de Odontología, Universidad de Chile; 2004.
22. Koru O, Toksoy F, Acikel CH, *et al.* Actividad antimicrobiana in vitro de las muestras de los propolis de diversos orígenes geográficos contra ciertos patógenos orales. *Revista Anaerobe del Departamento de Microbiología, división de parasitología médica, Escuela Médica Militar de la academia de Gulhane de medicina*. [Revista en línea] 2007 [consultado julio 2012]; 13(1). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475517>.
23. Zari G, Villalobos J, De los Ríos E, Ruiz S. Guía de prácticas de Farmacognosia II, Departamento de Farmacotécnia. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNT. 1a ed. Trujillo-Perú; 2007.
24. Dantas RV, Díaz R, Vieira MS, Queiroz M, Pereira J, Nascimento W W. Efecto clínico de una solución antiséptica a base de propóleos en niños con caries activa. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. Brasil: Universidad Federal de Paraíba* [revista en línea] 2006 [consultado Agosto 2012]; 6(001): 87-92 Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63760114>.
25. Gutiérrez S, Romero C, Hidalgo C, Pérez O, Díaz B. Acción antibacteriana de la tintura hidroalcohólica de propóleo al 4% en gérmenes de origen endodóntico. *Revista electrónica Archivos médicos de Camagüey, Cuba*. [revista en línea] 2012 [consultado Agosto 2012]; 6(001): 87-92 Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63760114>.
26. Solórzano DG. Estudio comparativo in vitro sobre el efecto antibacteriano del extracto de propóleo, paramonoclorofenol alcanforado e hidróxido de calcio en necrosis pulpar [Tesis pregrado]. Huánuco: Facultad de Ciencias de la Salud; 2011.
27. Gispert E, Cantillo E, Rivero A, Padrón M. Actividad anticaries de una crema dental con propóleos. *Revista Cubana de Estomatología*; [revista en línea] 2010 [consulta: Agosto 2012]; 37(3). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475072000003000006&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S003475072000003000006&script=sci_arttext).
28. Calderón A. Actividad antibacteriana in vitro de soluciones de propóleo etanólico sobre dos bacterias periodontopatogenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal. Hospital Militar Central [Tesis pregrado]. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM; 2010.
29. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Pubmed.gov. Kinshasa, Zaire*. [revista en línea] 2004 [consultado julio 2012]; 60(3): 222-227p. Disponible en: <https://www.thieme-connect.com/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-959463>