

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



**Facultad de Ciencias de la Salud
“Dr. Wilman Manuel Ruiz Vigo”
Carrera Profesional de Estomatología**

**EFEECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
PROPÓLEO DE CAJAMARCA FRENTE A COLONIAS DE
Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277) *in vitro***

**Bach. Karen Milagros Chugden Tacilla
Bach. Kelly Roxana Vergara Torres**

Asesora:

Mg. C.D. Sandra Jessenia Pesantes Sangay

Coasesor:

Mg. Mtblgo. Jorge Enrique Bazán Mayra

Cajamarca – Perú

Abril – 2018

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



**Facultad de Ciencias de la Salud
“Dr. Wilman Manuel Ruiz Vigo”
Carrera Profesional de Estomatología**

**EFEECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
PROPÓLEO DE CAJAMARCA FRENTE A COLONIAS DE
Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277) *in vitro***

**Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requerimientos para
optar el Título Profesional de Cirujano Dentista**

Autoras:

Bach. Karen Milagros Chugden Tacilla

Bach. Kelly Roxana Vergara Torres

Asesora: Mg. C.D. Sandra Jessenia Pesantes Sangay

Coasesor: Mg. Mtblgo. Jorge Enrique Bazán Mayra

Cajamarca – Perú

Abril – 2018

COPYRIGHT © 2018 by

KAREN MILAGROS CHUGDEN TACILLA

KELLY ROXANA VERGARA TORRES

Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN MANUEL RUIZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

**APROBACIÓN DE TESIS PARA OPTAR TÍTULO
PROFESIONAL**

**EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
PROPÓLEO DE CAJAMARCA FRENTE A COLONIAS DE**

Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277) *in vitro*

Mg. C.D. María del Pilar Álvarez Quiroz
PRESIDENTE

Mg. C.D. Lourdes Magdalena Yánac Acedo
MIEMBRO

Mg. C.D. Sandra Jessenia Pesantes Sangay
MIEMBRO

DEDICATORIA

A Dios por bendecirme siempre con su amor infinito.

A mis queridos padres Luis y Rosario, por todo el amor, por haber depositado su confianza en mí, pero sobre todo por su esfuerzo y apoyo incondicional que hicieron que lograra mis sueños.

A mi esposo por su amor, comprensión y apoyo incesante.

Karen Milagros Chugden Tacilla.

DEDICATORIA

A Dios por ser parte de mi vida diaria y por sus infinitas bendiciones.

A mis padres Nolberto y Roxana por darme todo su amor y apoyo incondicional, por la confianza que depositaron en mí desde que decidí iniciar con esta carrera: guiándome, apoyándome y acompañándome en cada paso para alcanzar mis metas.

A mi esposo Arturo por apoyarme en cada reto que se presenta en el camino con paciencia y amor.

A mi hijito Mathías por ser el motor encargado de sacar lo mejor de mí y además demostrarme que siempre hay una razón para sonreír.

Kelly Roxana Vergara Torres.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por protegernos y guiar siempre nuestros caminos, por concedernos la fuerza necesaria para continuar.

A la Mg. C.D. Sandra Jessenia Pesantes Sangay, por su apoyo invaluable e importante orientación con sus conocimientos para guiar nuestras ideas, y ha mostrado dedicación y compromiso como asesora.

Al Mg. Mtblgo. Jorge Enrique Bazán Mayra, por su extraordinario aporte durante el proceso de la presente tesis.

Karen y Kelly.

RESUMEN

La periodontitis se manifiesta como una reacción inflamatoria producida por diversos microorganismos, entre ellos la *Porphyromonas gingivalis*, agente etiológico de gran importancia en el desarrollo de esta enfermedad, cuya patogenicidad puede verse disminuida mediante el empleo de productos naturales. El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*. Se emplearon tres concentraciones del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, y 15% frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* y la prueba de dilución en medio líquido para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se encontró inhibición bacteriana en todas las concentraciones estudiadas. Al comparar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo de Cajamarca al 5%, 10% y 15% sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre los tres grupos. De todas las concentraciones la del 15% fue la que presentó mayor actividad antibacteriana. En referencia a la concentración mínima inhibitoria se comprobó que, en general el resultado fue negativo, es decir que no hubo crecimiento de la cepa *Porphyromonas gingivalis*, por tanto la concentración mínima inhibitoria fue de 2.5%.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, *Porphyromonas gingivalis*, propóleo.

ABSTRACT

Periodontitis manifests as an inflammatory reaction produced by various microorganisms, including *Porphyromonas gingivalis*, an etiological agent of great importance in the development of this disease, whose pathogenicity can be diminished by the use of natural products. The objective of the present study was to determine the antibacterial effect of the ethanolic extract of propolis from Cajamarca against colonies of *Porphyromonas gingivalis*, (ATCC 33277) *in vitro*.

Three concentrations of the ethanol extract of propolis at 5%, 10%, and 15% were used against colonies of *Porphyromonas gingivalis* and the dilution test in liquid medium to evaluate the concentration minimum inhibitory (CMI).

Bacterial inhibition was found in all the studied concentrations, when comparing the antibacterial activity of the ethanol extracts of Cajamarca propolis at 5%, 10% and 15% on the *Porphyromonas gingivalis* strain, statistically significant differences were found among the three groups. Of all the concentrations, 15% had the highest antibacterial activity.

In reference to the minimum inhibitory concentration, it was found that, in general, the result was negative, that is, there was no growth of the *Porphyromonas gingivalis* strain, therefore the minimum inhibitory concentration was 2.5%.

Key words: Antibacterial effect, *Porphyromonas gingivalis*, propolis.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CONTENIDO	ix
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE IMÁGENES	xv
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación de la investigación.....	2
1.4. Objetivos de la investigación	3
1.4.1. Objetivo general	3
1.4.2. Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II: MARCO CONCEPTUAL.....	5
2.1. Antecedentes del esquema conceptual.....	5
2.2. Bases del esquema conceptual	8

2.3. Definición de términos.....	21
2.4. Hipótesis de la investigación.....	22
2.4.1. Hipótesis de la investigación (Hi):.....	22
2.4.2. Hipótesis nula (H ₀):.....	22
2.4.3. Operacionalización de variables de la hipótesis.....	23
CAPÍTULO III: MÉTODOS.....	24
3.1. Tipo de investigación:	24
3.2. Diseño de la investigación:	24
3.3. Población:.....	24
3.4 Unidad de análisis:	24
3.5 Muestra.....	24
3.5.1 Criterios de selección de la muestra.....	24
3.5.2. Tamaño de la muestra	25
3.6 Técnicas de medición de datos e instrumento de medición de datos.....	26
3.6.1 Técnicas de medición de datos.....	26
3.6.2 Instrumento de medición de datos.....	26
3.7 Procedimiento de ejecución de la investigación	27
3.7.1 Procedimiento para recolección y preparación de la muestra de propóleo de Cajamarca.....	27
3.7.2 Procedimiento para determinación de metabolitos secundarios del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca	29
3.7.3 Procedimiento para determinación de la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i>	35
3.8 Técnica de análisis de datos	42

3.9 Aspectos éticos de la investigación.....	42
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1. Resultados	44
4.2 Discusión.....	51
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
5.1. Conclusiones	55
5.2. Recomendaciones.....	55
7. REFERENCIAS	56
LISTA DE ABREVIACIONES	64
GLOSARIO	65
ANEXOS	66
ANEXO 1.....	66
ANEXO 2.....	67
ANEXO 3.....	68
ANEXO 4.....	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Matriz de operacionalización de variables.....	23
---	-----------

LISTA DE TABLAS

Tabla 1a. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277).....	46
Tabla 1b. Comparaciones múltiples pos hoc para determinar significancias entre grupos	48
Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonias de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277).....	49

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonia de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).....47**
- Gráfico 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).....50**

LISTA DE IMÁGENES

Imagen 1. Obtención del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca.....	69
Imagen 2. Preparación del extracto etanólico del propóleo de Cajamarca.....	70
Imagen 3. Reacciones químicas de la determinación de metabolitos secundarios del extracto etanólico del propóleo.....	73
Imagen 4. Preparación de caldo BHI y agar sangre.....	76
Imagen 5. Activación de la cepa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277)...	77
Imagen 6. Susceptibilidad <i>in vitro</i> a antibacterianos.....	78
Imagen 7. Lectura e interpretación.....	79
Imagen 8. Prueba de turbidez para CMI.....	80

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal es una de las patologías más prevalentes en la cavidad oral.¹ En nuestro país, según datos del MINSA, la prevalencia de personas que presentan esta enfermedad es de un 85 %.² Así también en Cajamarca, los pacientes que acuden a la consulta odontológica, en su mayoría, padecen de enfermedad periodontal, la cual se manifiesta como una reacción inflamatoria, producida por microorganismos presentes en la placa dental, encontrándose casos cada vez más frecuentes de estadios avanzados de la enfermedad como en el caso de la periodontitis. Entre los microorganismos causales de la periodontitis podemos encontrar a la *Porphyromonas gingivalis*, este microorganismo; además, de ser uno de los más periodontopatógenos presenta una etiología bacteriana predominante, siendo este motivo de gran interés para estudiar alternativas terapéuticas e indagar sobre agentes bacteriostáticos que ayuden a combatir a este microorganismo, siendo objeto de estudio en la presente investigación.^{3,4}

Existen múltiples tratamientos para la periodontitis, los cuales dependerán del progreso de la enfermedad como por ejemplo a la profilaxis dental, raspado y alisado radicular, cirugía periodontal, entre otros, además, estos tratamientos tienen como coadyuvantes a diferentes antisépticos orales, siendo el más usado el gluconato de clorhexidina, el cual es considerado como el gold estándar en la actualidad; sin embargo, sus efectos adversos como: reacciones alérgicas, descamación de la mucosa, disgeusia (cambios en el sentido del gusto o sabor metálico), manchas en los dientes, sensación urente en la lengua⁵; han centrado los estudios en el

descubrimiento de una nueva alternativa de tratamiento, con menos efectos adversos, teniendo como base a fuentes brindadas por la naturaleza.^{6, 7,8} En este sentido, Cajamarca posee una flora muy variada, rica y única; constituida en su mayoría por coníferas, destacando el eucalipto, pino, ciprés y otras especies, las mismas que servirán, entre otras, a las abejas como fuente de alimentación y como materia prima para producir el propóleo,⁹ el cual ha sido motivo de múltiples estudios por sus excelentes propiedades; sin embargo, no existen estudios específicos del propóleo en Cajamarca y no se conoce si este presenta efecto antibacteriano al igual que los demás, ya que como bien es sabido gracias a investigaciones de otras regiones, sobre la composición del propóleo¹⁰; las propiedades de este varía según el lugar de recolección, debido a la vegetación del cual la abeja se alimenta.

1.2 Formulación del problema

¿Posee efecto antibacteriano el extracto etanólico de propóleo de Cajamarca frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*?

1.3 Justificación de la investigación

En nuestro país y en nuestra región cajamarquina, los pacientes con enfermedad periodontal son cada vez más frecuentes y muchos de ellos se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad, como en el caso de la periodontitis, en donde la *Porphyromonas gingivalis* constituye uno de los microorganismos más periodontopatógenos y con etiología bacteriana predominante. Los coadyuvantes orales empleados en la actualidad como complemento a la terapia periodontal, presentan diferentes efectos adversos, por lo que, en la búsqueda de una nueva

alternativa terapéutica se ha estado estudiando el propóleo, producto de carácter natural, ampliamente investigado por sus grandes propiedades medicinales; sin embargo la variación de sus resultados en otras regiones por la zona, clima, humedad, contaminación, flora, entre otros, y a su vez la variación de sus principios activos demostrada en diversas investigaciones, vuelve necesario su estudio en nuestra región cajamarquina, ya que no existen evidencias científicas de sus componentes ni de su efectividad antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*, por lo que el propóleo de nuestra región podría presentar mayor o menor efecto que el de otros lugares; además, por ser un producto de origen natural, posee diversas ventajas que podrían convertirlo en una excelente alternativa terapéutica, accesible, de bajo costo y con menos efectos colaterales indeseables para nuestros pacientes con enfermedad periodontal.

1.4. Objetivos de la investigación

1.4.1. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*.

1.4.2. Objetivos específicos

- a) Determinar la susceptibilidad bacteriana de colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) en concentraciones de 5 %; 10 % y 15 % del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca *in vitro*.

b) Determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*.

CAPÍTULO II: MARCO CONCEPTUAL

2.1. Antecedentes del esquema conceptual

Koru *et al.*¹¹, en su estudio, evaluó la actividad antimicrobiana de cinco muestras de propóleo de diferentes regiones, cuatro fueron de Turquía y una de Brasil, contra nueve cepas anaerobias (*P. anaerobius*, *P. micros*, *L. acidophilus*, *A. naeslundii*, *P. oralis*, *P. melaninogenica*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y *V. párvula*), en donde los diferentes propóleos fueron seleccionados según los criterios tales como el entorno sumamente limpio y libre de plaguicidas; además se usó el método de difusión en agar, en el cual, el tamaño del inóculo se verificó mediante la colocación en placas de disoluciones en serie y el recuento de colonias; concluyendo que los extractos etanólicos de propóleo tienen eficacia antimicrobiana frente a *Porphyromonas gingivalis*, y además eran más efectivas contra bacterias anaerobias Gram positivas que para Gram negativas.

Speranca¹², realizó un estudio cuyo objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso de propóleo (EAP) a concentraciones de 5 %, 10 %, 20 % y 30 % sobre microorganismos de bolsas periodontales; usando el método de difusión en agar. Obtuvo como resultado que el EAP se mostró sensible en todas las concentraciones y sin presentar diferencias significativas tanto en anaerobios facultativos, que presentaron un halo de 16.2 mm correspondiente al EAP al 30 %, como también en microaerófilos, con un halo de 16.12 mm para EAP al 30 %.

Calderón¹³ realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de soluciones de propóleo etanólico a diferentes concentraciones sobre dos bacterias periodontopatógenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal, utilizando el método de difusión de disco, para lo cual se seleccionaron 20 pacientes, con presencia de signos clínicos de inflamación causada por periodontitis según los índices epidemiológicos periodontales; posteriormente se tomó la muestra con conos de papel de endodoncia estériles, las cuales fueron insertadas en la profundidad del saco, durante 15 a 20 segundos; luego se colocaron en tubos (rotulados con el código del paciente) conteniendo Caldo Tioglicolato. Los resultados mostraron que todas las concentraciones de propóleo etanólico presentaron actividad antibacteriana; con promedios para el propóleo etanólico al 5% de 17.15 mm, para el 15% de 22 mm y en menor diámetro para el 30% de 15.9 mm.

Koo *et al.*¹⁴, en su estudio, evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* mediante la utilización de extracto de propóleo frente a 15 microorganismos, dentro del cual estuvo la cepa de *Porphyromonas gingivalis*, la actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en agar y se midieron las zonas de inhibición del crecimiento. Concluyeron que el extracto de propóleo inhibió significativamente todos los microorganismos ensayados.

Rodríguez¹⁵, realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de cuatro soluciones de extracto de propóleo (50ug, 100ug, 200ug y 500ug) frente a cepas anaerobias, como *Porphyromonas gingivalis*, se utilizó el medio de agar Shadler en placas de petri y el método por discos de papel según la

tecnica de Kirby Bauer. Concluyó que todas las concentraciones de extracto etanólico de propóleo presentaban actividad antibacteriana frente a *Porphyromonas gingivalis*.

Reyes¹⁶, en su estudio tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo peruano (EEPP) sobre cultivos *in vitro* de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, tomando como control positivo a la clorhexidina 0,12 %. Se seleccionaron 15 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica, posteriormente se tomó la muestra con conos de papel número 30 y se colocó dentro del saco periodontal durante 30 segundos, luego se llevaron las muestras al laboratorio de microbiología para su procesamiento, en donde se utilizó el método de difusión en discos con las soluciones experimentales y se incubó en condiciones de anaerobiosis, por 24h y 48h a 37° C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición, concluyendo que existe una mayor actividad antibacteriana del EEPP que la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

Díaz y Proaño¹⁷, realizaron un estudio cuyo objetivo fue comparar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo en concentraciones al 1%, 5% y 10% de Oxapampa – Perú con gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre *Porphyromonas gingivalis*, en donde la actividad antibacteriana se determinó usando el método de difusión en el agar. Los halos de inhibición se midieron con un calibrador. Obtuvieron como conclusión que el extracto etanólico de propóleo al

10% presentó mayor efectividad antibacteriana comparado con gluconato de clorhexidina al 0,2%.

Agarwal G ,Vemanaradhya G y Mehta D ¹⁸, en su estudio, evaluaron la composición química, la eficacia antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo chino en *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*). Se utilizó el método de pocillo de agar para ver la susceptibilidad bacteriana, y para determinar la CMI se usó la técnica de disolución de tubo en serie. Concluyeron que el propóleo posee actividad antimicrobiana muy potente frente a periodontopatógenos, y esto se debe a su composición química; ya que presentó 19% de flavonas, 2.616% de flavonoles y 16. 176% de flavanonas; con respecto a la actividad antibacteriana los halos de inhibición varió de 18 a 25mm para *Pg* y para *Aa* fue del 12 al 14 mm, en cuanto a la CMI fue de 0,1 ug/ml; por lo que sugiere su posible uso como una alternativa natural de tratamiento utilizable en la terapia sistémica periodontal.

2.2. Bases del esquema conceptual

Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una patología que afecta a los tejidos de soporte del diente, causada por microorganismos presentes en la placa dental.¹⁹

La enfermedad periodontal se divide en dos tipos según su progreso: gingivitis y periodontitis. La gingivitis afecta únicamente a la encía, por lo cual, es un proceso reversible. La principal señal de alerta es el sangrado, pero si el proceso continúa con

el tiempo podría desembocar en una periodontitis. La periodontitis no solo afecta a la encía, esta produce una destrucción más profunda que afecta a todos los tejidos que soportan el diente. Es un proceso irreversible que podría provocar la pérdida del diente, además que la periodontitis puede afectar a la salud en general.²⁰

Factores de riesgo de la enfermedad periodontal

Según el concepto actual de la etiología multifactorial de las enfermedades periodontales, éstas se producen por la interacción de un agente microbiano, único o múltiple, un huésped más o menos susceptible, y unos factores ambientales que influyen sobre ambos. Así pues tenemos: agentes microbianos, factores de susceptibilidad del huésped, factores genéticos, enfermedades sistémicas y factores ambientales (higiene oral y el tabaco).²¹

Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas

El término infección se emplea para referirse a la presencia y multiplicación de microorganismos en el cuerpo. Así pues las infecciones periodontales son un conjunto de enfermedades localizadas en la encía y las estructuras de soporte del diente (ligamento y hueso alveolar); producidas por ciertas bacterias provenientes de la placa subgingival. Las bacterias anaerobias Gram negativas más importantes y prevalentes en el área subgingival son el *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermedia* (Pi) y *Tannerella forsythensis* (Tf). Estas bacterias tienen un importante papel en el comienzo y posterior desarrollo de la periodontitis participando en la formación de la bolsa periodontal, destrucción

del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de un mecanismo inmunopatogénico.²²

Además se ha demostrado que la *Porphyromonas gingivalis* es la más predominante, considerándola la más agresiva por sus múltiples factores de virulencia.⁴

Porphyromonas gingivalis

Las bacterias son los microorganismos con mayor presencia en el biofilm dental,³ estando por ello más relacionadas con las patologías periodontales, como la periodontitis.^{23, 24} De todos los microorganismos aislados de esta lesión, el predominante es la *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), un Gram negativo, anaerobio estricto que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño. Esta bacteria produce varios factores de virulencia,³ así como su capacidad de invadir células periodontales, dándose una protección contra el sistema de defensa del huésped.^{25,26} También se ha identificado a este microorganismo, como un factor de riesgo para infecciones pulmonares, parto pre término y bajo peso al nacer.^{27,28}

P. gingivalis que es la más agresiva una vez que llega a su habitat, se condiciona al medio para vivir en condiciones de oxidoreducción negativa, así como por su diversidad de factores de virulencia, rompe la homeostasis en el surco, generando una destrucción continua y agresiva de los tejidos de sostén del diente, llegando a degradar hueso y tejidos blandos. Esta destrucción va a generar signos clásicos como enrojecimiento perisulcular, incremento de la profundidad del surco gingival,

sangrado al estímulo, movilidad de diversos grados, que con la cronicidad de la lesión puede perderse la pieza dentaria.⁴

Morfología y estructura

P. gingivalis es un bacilo corto o cocobacilo, que mide de 0.5 - 0.8 um x 1 - 3.5 um anaerobio estricto, Gram negativo, siendo considerado un comensal en la cavidad oral.³ Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa las endotoxinas, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. A nivel superficial presenta vesículas que contienen una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.²⁹

Por otro lado como ya se sabe actualmente existen diversos agentes bacteriostáticos para combatir la enfermedad periodontal como es el gluconato de clorhexidina y que además está considerado como el gold estándar en el tratamiento de dicha enfermedad, a pesar de que al ser un producto químico el riesgo de reacciones adversas de los pacientes es mayor.⁸

La clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40, por Imperial Chemical Industries, en Inglaterra, por científicos que realizaban un estudio sobre la malaria. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos denominados polibiguanidas, que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel. En odontología se utilizó inicialmente para desinfección de la boca y endodoncia.^{30,31}

Es un potente antiséptico del grupo de las biguanidas que actúa eficaz y rápidamente como bactericida sobre microorganismos Gram (+) y (-), pero poco eficaz sobre bacterias acidorresistentes hongos o virus. Se utiliza para enjuagues bucales en el tratamiento de la gingivitis y de periodontitis, entre otras.³²

El gluconato de clorhexidina desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas, precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular. En las bacterias Gram negativas, el gluconato de clorhexidina afecta la membrana exterior permitiendo la liberación de las enzimas periplasmáticas. La membrana interna de estos microorganismos no es destruida, pero sí que es impedida la absorción de pequeñas moléculas. A bajas concentraciones, el gluconato de clorhexidina exhibe un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida. Suele presentarse en concentraciones, al 0,12%, 0,2% y 0.4%.³²

Entre las reacciones adversas del gluconato de clorhexidina, tenemos que su efecto adverso más común es la pigmentación marrón de los dientes, de algunos materiales de restauración y de las mucosas, sobre todo del dorso de la lengua. Se produce una interacción entre la molécula que por un grupo catiónico está unida a la superficie del diente y por el otro grupo en vez de unirse a bacterias, se une a sustancias dietéticas ricas en taninos, produciéndose una pigmentación; así productos como el té, el vino tinto o el café potencian la pigmentación.³³

Otro efecto descrito frecuentemente es la alteración del gusto. Se han descrito también lesiones descamativas en la mucosa alveolar después de enjuagues al 0,2%. La descamación de células epiteliales puede ocurrir más frecuentemente con alta concentración que con baja. Además de presentar reacciones adversas importantes para el paciente, el costo elevado, hace que algunos pacientes se encuentren limitados a acceder a dicho producto.³⁴

Por otro lado tenemos que actualmente 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 tal forma que no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados.³⁵

Fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de derivados de plantas, nunca ha dejado de tener vigencia. En el ámbito odontológico, el importante crecimiento mundial de la fitoterapia dentro de programas preventivos y curativos ha estimulado la investigación, con el fin de avalar la actividad antimicrobiana de distintos derivados de plantas. Así pues, la región Cajamarca es privilegiada por su gran diversidad biológica, o biodiversidad, es una región rica en su flora, por tanto existen numerosas plantas, las cuales, sirven entre otros, a las abejas, como alimento y como fuente para extraer materia prima como es el propóleo, el cual cuenta con propiedades bacterianas que servirán para solucionar problemas de enfermedad periodontal que padece la población cajamarquina y por ende, el Perú entero.³⁵

Propóleo

El propóleo es una sustancia natural pegajosa que las abejas producen a partir de las resinas de la corteza de ciertos árboles y de la yema de estos; de color verde pardo, castaño o incluso casi negro (dependiendo de su origen botánico); de consistencia viscosa, sabor acre, frecuentemente amargo; y olor agradable y dulce, de forma que, cuando se quema, exhala una fragancia de resinas aromáticas; conocida por el hombre desde tiempos remotos.^{36, 37}

A lo largo de la historia, fuimos aprendiendo que no solo las abejas pueden darle usos al propóleo, sino también los humanos, pues antiguamente era usado para embalsamar cadáveres, como calmante de infecciones, para tratar las maderas de instrumentos musicales y para cicatrizar heridas por sus propiedades antisépticas.³⁷

Así es como el propóleo ha acompañado a la historia de la humanidad por muchos años. En las civilizaciones de Egipto se usaba el propóleo en unguento para curar heridas de guerra por sus propiedades antisépticas y los sacerdotes lo utilizaban para embalsamar sus cadáveres. En Grecia Aristóteles la menciona llamándola “remedio para las infecciones de la piel, las llagas y las supuraciones”.³⁷ Los incas utilizaban esta sustancia antes de la venida del español a América para curar cuadros de fiebre. Cuando comienzan los avances tecnológicos del siglo XX, el propóleo fue quedando en el olvido y hasta llega a desaparecer el concepto en algunos diccionarios; recién en las décadas de los 60 y los 70 es que el propóleo vuelve a ser investigado en China,

América, Polonia y Rusia. Estas investigaciones realizadas tanto por científicos como por apicultores, vuelven a demostrar las capacidades de su uso.³⁸

La palabra propóleo deriva del griego *propolis*; pro: para o en defensa, y polis: la ciudad; es decir, “defensa de la ciudad o la colmena”.³⁸

Existen dos versiones sobre la procedencia del propóleo elaborado por las abejas. Una versión dice que el propóleo es recolectado por abejas de más de quince días y que, con sus mandíbulas, toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas: álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, pino y algunas herbáceas, tras sujetar la partícula resinosa, la abeja mueve hacia atrás la cabeza hasta que logra desprenderla, almacenándola con sus patas en los cestillos del polen. Los 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 a que el calor del sol ablande la carga y pueda desprenderse mejor de ella. Los vuelos que realiza las abejas desde la colmena a la planta portadora de resina, duran de quince a veinte minutos, y la época de máxima recolección tiene lugar al final del verano.³⁸ Otra versión 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 buche y el intestino medio.³⁸

Las abejas emplean el propóleo con diversos fines. Principalmente lo usan para tapar las fisuras y quebraduras de la colmena. En las zonas frías, las abejas lo emplean para reducir la piquera, de ahí que el observar una gran cantidad de propóleo es augurio de un invierno frío. Otra finalidad es la de embalsamar a algún animal muerto en el interior de la colmena, con la finalidad de aislarlo, ante la dificultad que supondría sacarlo fuera debido a su tamaño (en ocasiones se han encontrado perfectamente embalsamados ratones, lagartos e incluso serpientes). Las abejas emplean también el propóleo con la misión de encolar o pegar las partes móviles de la colmena. Por último, las abejas emplean el propóleo para recubrir los panales antes de la puesta de los huevos, con vistas a una desinfección de la zona de puesta.³⁸

a. La composición química

La composición química del propóleo es muy compleja y no es fija, varía según la región en que se colecte y el tipo de vegetación que rodea las colmenas, aunque en cada muestra de propóleo hay 80 a 100 compuestos que son identificados de forma constante. Estos componentes son resinas y bálsamos vegetales en un 50%, ceras en un 30%, aceites esenciales 10%, polen 5%, además de minerales, polisacáridos, proteínas, aminoácidos, aminos, y compuestos orgánicos en un 5%. El mayor componente del propóleo son los flavonoides como son: ácido cafeico, quercetin, baicalina, pinocembrina, naringuina, galanguina y crysina. Estos son los responsables de la acción antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria del propóleo.^{39, 40}

Algunos autores plantean la existencia de alrededor de 18 componentes y se señalan que entre estos los principales son compuestos del tipo flavonoide, tales como, las flavonas, flavones y las flavononas. Se han reportado alrededor de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos . Una de las propiedades más importantes de los flavonoides es su actividad antimicrobiana, además que tiene una acción catecolamina, la cual es capaz de retrasar la oxidación del propóleo protegiendo a los lípidos y vitamina C, es decir, el propóleo posee propiedad antioxidante.⁴⁰

En un estudio de propóleos en Portugal encontraron que los porcentajes de fenoles contenidos en el propóleo variaban entre 11,1% y 28,2% y el de flavonoides variaba entre 3, 10 y 12%. Estas concentraciones dependían de la región donde era colectado el propóleo.⁴¹

b. Actividad biológica

Las propiedades farmacológicas del propóleo son bien conocidas y están bien documentadas. La literatura actual señala propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales, analgésicas, anticancerígeno, antioxidantes y antiocariogénicas.⁴²

Algunos de los compuestos importantes por lo que el propóleo tiene actividades biológicas son:

- **Pinocembrina:** Actividad antibacteriana, fungicida, y utilidad como anestésico local.⁴³

- **Acacetina:** Propiedades antiinflamatorias.⁴³

- **Conferido:** Promisorio agente anticarcinogénico al inducir directamente quinona reductasa y otras enzimas protectoras, sin promover la activación de otros carcinógenos.⁴³

- **Galangina:** Es uno de los flavonoides que con mayor frecuencia se han encontrado en propóleos, presenta actividad antimutagénica, antioxidante, secuestrador de radicales libres y modulador de actividad de enzimas metabólicas, pero se le destaca principalmente por su capacidad antigenotóxica como un potente agente protector frente al cáncer. Además posee actividad antibacteriana.⁴³

c. Reacciones adversas

Son escasas las reacciones adversas del propóleo. No obstante se han reportado casos de dermatitis de contacto y mucositis oral. La mayor parte de reportes se describen con dermatitis en las 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 oral) por consumo de productos a base de propóleo.^{44, 45}

d. Aplicaciones en estomatología

-A nivel periodontal: El propóleo ha demostrado propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, anestésicas y cicatrizantes en casos de gingivitis crónicas y úlceras bucales recurrentes y para mejorar el tratamiento periodontal. Otros estudios realizados con soluciones de propóleo, han demostrado que actúa a nivel de la placa

supragingival (en Gram +) ayudando a la recuperación de los tejidos y estimulando la respuesta inmune local. Como antiinflamatorio, inhibe la síntesis de prostaglandinas y ayuda al sistema inmune promoviendo la fagocitosis y estimulando la inmunidad celular.⁴⁶

Algunos autores han creado parches bucales para lograr la liberación de propóleo lentamente, logrando buenos resultados, encontraron en un gel mucoadhesivo que conteniendo propóleo y aplicado en bolsas periodontales, podía ser usado con éxito en el tratamiento de la enfermedad periodontal, encontraron también que el propóleo en solución usado como irrigante previo al tratamiento periodontal obtenía muy buenos resultados.⁴⁷

-En operatoria dental: Se ha usado con éxito en la regeneración de la pulpa dental en los casos de exposición accidental usado para recubrimiento pulpar directo. También en el tratamiento de la hipersensibilidad dental es usado con gran éxito.⁴⁸

-En endodoncia: Como medicación, en el tratamiento de conductos es muy efectivo. Se realizaron estudios como la comparación con el hipoclorito de sodio en cuanto a la eficacia como irrigante siendo igual de efectivo que el propóleo.⁴⁹

-En cirugía: Numerosos estudios han demostrado la utilidad de colocar los dientes avulsionados que se van a reimplantar como forma de conservación para su transporte en una solución hidroalcohólica de propóleo a 10%, Ozan, *et al.* demostraron que esta es una mejor forma de conservación que la leche o la solución salina. Se ha utilizado en heridas quirúrgicas post extracción (solución hidroalcohólica al 10%) y actúa

sobre la epitelización de las heridas y aceleración de la cicatrización. También se ha usado en los casos de complicaciones post-extracciones como es en las alveolitis. Magro, *et al.* encontraron que el uso de propóleo reduce la inflamación luego de la cirugía además de tener efecto analgésico según Bruschi, *et al.* 2012. En estos casos se puede usar mezclado con miel en la proporción 90% de miel y 10% de propóleo.⁵⁰

-En prótesis: La estomatitis dental es frecuente en los pacientes que usan prótesis removibles ya sean completas o parciales, siendo la *Cándida albicans* un factor de infección debido a una mala higiene tanto de la prótesis como de las mucosas.

Cándida albicans es un hongo que se sitúa entre la base de la prótesis y la mucosa.⁵⁰

Los productos a base de propóleo tienen grandes propiedades antifúngicas especialmente sobre esta según Ramos, *et al.* 2012, pudiéndose usar como enjuagatorios bucales o en forma de gel.

Propóleo de Cajamarca

Según la ubicación geográfica u origen botánico en el Perú se puede encontrar diversos tipos de propóleo, pues la altura de la zona de recolección y la escasa o nula contaminación de la región son características que le confieren un valor agregado al propóleo de Cajamarca.⁵¹

Las plantas que aportan la mayor parte de bálsamos y resinas que componen al propóleo, se debe a la diversidad botánica que es muy amplia en Cajamarca, identificándose especies vegetales como: eucalipto (*Eucaliptus globulus L.*), ciprés (*Cupressus sempervirens L.*), mutuy (*Senna cajamarcae H.S.Irwin & Barneby*), molle

(*Schinus molle* L.), pino (*Pinus sp.*), chilca (*Baccharis latifolia* - R&P. - Pers.), sauce (*Salix sp.*), penca (*Agave sisilana* Perriene.), mango (*Manguifera indiica* L.), palta (*Persea americana*).⁵¹

Efecto de inhibición antibacteriana frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)

Es la operatividad antibacteriana determinada mediante el diámetro del halo de inhibición. El indicador del efecto antibacteriano es el diámetro del halo de inhibición, el cual es la zona alrededor de un disco de antibacteriano (“propóleo”) en el que no se produce crecimiento de la bacteria que ha sido inoculado en una placa de Petri.

2.3. Definición de términos

a. *Porphyromonas gingivalis*: Es un microorganismo considerado uno de los más periodontopatógenos; cocobacilo, anaerobio estricto Gram negativo que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño.³⁰

b. Propóleo: Es una sustancia natural parecida a una resina pegajosa que las abejas obtienen de las resinas de la corteza de ciertos árboles.³⁷

c. Gluconato de clorhexidina al 0.12%: La clorhexidina es el agente más efectivo para tratamientos periodontales.³³

2.4. Hipótesis de la investigación

2.4.1. Hipótesis de la investigación (H_i):

El extracto etanólico de propóleo de Cajamarca posee efecto antibacteriano frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*.

2.4.2. Hipótesis nula (H₀):

El extracto etanólico de propóleo de Cajamarca no posee efecto antibacteriano frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*.

2.4.3. Operacionalización de variables de la hipótesis

Cuadro 1. Matriz de operacionalización de variables de la hipótesis de investigación.

Variables	Indicadores	Categoría (valores)	Escala
Extracto etanólico de propóleo de Cajamarca	Concentración	E.E. Propóleo 5% E.E. Propóleo 10% E.E. Propóleo 15%	Nominal
Efecto antibacteriano	Diámetro del halo de inhibición bacteriana	Milímetros (mm)	De razón

CAPÍTULO III: MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación: Básica

3.2. Diseño de la investigación: Experimental

3.3. Población: La población estará constituida por colonias de *Porphyromonas gingivalis* de la cepa ATCC 33277.

3.4 Unidad de análisis: Cada placa de Petri y tubo de ensayo conteniendo colonias de *Porphyromonas gingivalis*.

3.5 Muestra

3.5.1 Criterios de selección de la muestra

Criterios de inclusión

- Placas de Petri que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* en buen estado de conservación.
- Tubos de ensayo que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* en buen estado de conservación.

Criterios de exclusión

- Placas de Petri que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* hayan sufrido deterioro durante la activación de la cepa.

- Tubos de ensayo que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* hayan sufrido deterioro durante la activación de la cepa.

Criterios de eliminación

- Placas de Petri que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* que hayan sufrido contaminación durante el cultivo o la ejecución del estudio.
- Tubos de ensayo que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* que hayan sufrido contaminación durante el cultivo o la ejecución del estudio.
- Placas que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* hayan sufrido deterioro durante la activación de la cepa.
- Tubos que contengan la siembra de *Porphyromonas gingivalis* hayan sufrido deterioro durante la activación de la cepa.

3.5.2. Tamaño de la muestra

El tamaño de muestra para el presente estudio estará determinado por la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2s^2}{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2} = 1.96$; para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$

$Z_{\beta} = 0.84$; para una potencia de prueba de $\beta = 0.20$

$S = 0.8 (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)$ el cual es un valor asumido por no haber estudios similares.

Luego reemplazando obtenemos:

$n = 10$ repeticiones

Luego la muestra estuvo conformada por $n = 10$ repeticiones para cada concentración.

3.6 Técnicas de medición de datos e instrumento de medición de datos

3.6.1 Técnicas de medición de datos

Observación

3.6.2 Instrumento de medición de datos

Pie de rey, con el cual medimos los halos de inhibición de cada disco, seguidamente en una ficha de control, se anotó el diámetro de los halos de inhibición según milímetros (mm) en las placas de Petri, tanto del extracto etanólico en las concentraciones 5%, 10% y 15% y el gluconato de clorhexidina al 0,12%, según el CLSI (18 a 24), 4 y 7 días, considerando el lento crecimiento de colonias de *Porphyromonas gingivalis*.

3.7 Procedimiento de ejecución de la investigación

3.7.1 Procedimiento para recolección y preparación de la muestra de propóleo de Cajamarca

Todo el procedimiento para la elaboración extracto etanólico de propóleo de Cajamarca se realizó en el laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo - Perú.

a) Recolección de la muestra de propóleo de Cajamarca

Las muestras de propóleo provenientes de abejas *Apis mellifera*, se recolectaron de los apiarios del caserío Huambocancha Chica, perteneciente a la región Cajamarca, dicho caserío está al norte de la ciudad, cuya foresta está integrada por árboles propios de la zona, como son: eucalipto (*Eucalyptus globulus L.*), ciprés (*Cupressus sempervirens L.*), mutuy (*Senna cajamarcae H.S.Irwin & Barneby*), molle (*Schinus molle L.*), pino (*Pinus sp.*), chilca (*Baccharis latifolia - R&P. - Pers.*), sauce (*Salix sp.*), penca (*Agave sisilana Perriene*), (*Persea americana*) palta.

El propóleo se recolectó mediante la “técnica de raspado” (con espátula); la cual es considerada como la más tradicional, por ser una de las mejores, ya que evita el desprendimiento de astillas de madera, con lo que se obtendrá un propóleo con menos impurezas, a diferencia de otras técnicas utilizadas. Consiste en desprender el propóleo de aquellas zonas donde se encuentra adherido: ángulos, marcos, piezas metálicas, piquera.³⁸ Todas las muestras se recolectaron entre los meses de noviembre y diciembre, de 2017. El muestreo se efectuó en forma aleatoria de diferentes

colmenas de cada apiario para formar una muestra representativa. Posteriormente, se colocaron en frascos de vidrio estériles de color ámbar para evitar la contaminación de las muestras y protegerlo de la luz. Luego se transportaron al laboratorio.

b) Obtención del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca

Antes de preparar los extractos, se eliminaron las impurezas visibles que se encuentran en el propóleo, tales como virutas de madera, partes de abejas y restos vegetales.

Las muestras de propóleo en bruto se fraccionaron en trozos de 2 cm aproximadamente y fueron colocados en refrigeración a 0 °C por 24 horas para solidificarlas. Luego, se trituraron los trozos en un mortero y se pesaron por separado 30 g de muestra sometiendo a extracción sucesiva con 100 ml de etanol al 96 °GL (3 x 100 ml) en un agitador magnético, durante 48 horas, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Posteriormente, el material se filtró a través del papel filtro Whatman N° 40. A los filtrados combinados, se les eliminó las ceras mediante precipitación y filtración con adición de agua destilada (50 ml) y refrigeración del extracto a -18 °C. Finalmente, se evaporó el solvente de los filtrados en un evaporador rotatorio a presión reducida a una temperatura de 40 °C. A partir del extracto seco se preparó las concentraciones de 5%, 10% y 15%.

Los extractos etanólicos de propóleos obtenidos (EEP) se almacenaron en viales ámbar y se llevaron a refrigeración entre 4 a 8 °C hasta su posterior ensayo microbiológico.

3.7.2 Procedimiento para determinación de metabolitos secundarios del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca

Todo el procedimiento para la elaboración extracto etanólico de propóleo de Cajamarca se realizó en el laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo (Perú). Adicionalmente, para la presente investigación, se realizó un estudio para la determinación de metabolitos secundarios del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca el cual se basó en el método propuesto por Miranda⁵² y Lock⁵³ (Anexo 1).

1. Catequinas

Ensayo de catequinas

Para ello, se tomó de la solución etanólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y se aplicó la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha se aplicó la solución de carbonato de sodio.

La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indicó un ensayo positivo.

2. Lactonas

Ensayo de Baljet

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, para ello, se colocó 1 ml del extracto etanólico en un tubo de ensayo y se adicionó 1 ml del reactivo Baljet. La aparición de una coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente, se consideró positivo.

3. Triterpenos y esteroides

Ensayo de Lieberman-Burchard:

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adicionó 1 ml de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan caer 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- 1- Rosado-azul muy rápido.
- 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
- 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio. El tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

Importante: Para realizar este ensayo no puede haber agua en el medio de reacción pues esta con el ácido sulfúrico reacciona de forma violenta y puede ocurrir un accidente.

La reacción de Lieberman-Burchard se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura. Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos, xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

4. Quinonas

Ensayo de Borntrager: Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello, se evaporó el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 ml de cloroformo. Se adicionó 1 ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (+), coloración roja (++)

5. Saponinas

Ensayo de la espuma: Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluyó con 5 veces su volumen en agua y se agitó la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

6. Compuestos fenólicos

Ensayo del cloruro férrico: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A 1 ml del extracto alcohólico se le adicionó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A 1 ml del extracto se añadió acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- a. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- b. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- c. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

7. Flavonoides

Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluyó con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se esperó 5 minutos, se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezclaron las fases y se dejó reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procedió de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intenso en todos los casos.

8. Antocianidina

Ensayo de antocianidinas

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se calentó 2 ml del extracto etanólico 10 min. con 1 ml de HCl conc. Se dejó enfriar y se adiciona 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico. Se agitó y se dejó separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.

9. Taninos

Ensayo de Gelatina: Permite reconocer la presencia de taninos en el extracto acuoso. Para ello el extracto se evaporó hasta sequedad y luego se reconstituyó con agua y se filtró. Luego se añadió 1 ml de la solución de gelatina al 1%. El ensayo se considera positivo, cuando aparece un precipitado blanco.

10. Cardenólidos

Ensayo de Kedde

Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. 1 ml del extracto en etanol se mezcló con 1 ml del reactivo y se dejó reposar durante 5-10 minutos.

Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas. El reactivo de Kedde se preparó de la siguiente forma:

-Solución 1: Ácido 3.5 dinitrobenzónico al 2 % en metanol.

-Solución 2: Hidróxido de potasio al 5.7 % en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcló igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo.

Dicha mezcla es la que se adicionó a la alícuota a evaluar.

11. Alcaloides

Ensayo de Dragendorff: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, este se evaporó en baño de agua y el residuo se disolvió en 1 ml de ácido clorhídrico al 1 % en agua.

A 1 ml de extracto se le añadió 1 gota de ácido clorhídrico concentrado. Con la solución acuosa ácida se realizó el ensayo y se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).

Ensayo de Mayer: Se procedió de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida, añadiendo una pizca de cloruro de sodio en polvo se agitó y filtró. Se añadió 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

Ensayo de Wagner: Se realizó al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, se añadieron 2 o 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

Gracias al adicional procedimiento para evidenciar los metabolitos secundario del propóleo de Cajamarca; se verificó que dicho propóleo posee mucha más intensidad de metabolitos secundarios a diferencia de otras regiones, tales como lactonas; las cuales son las responsables de brindar diferentes actividades biológicas, tales como antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antibacteriana, anticancerígena, antiviral, antifúngica, así como su potencia alérgica.⁵⁴

3.7.3 Procedimiento para determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro*

Todo el procedimiento experimental de este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas S.R.L. (InvBiomed S.R.L).

Cepa bacteriana para el estudio

Se trabajó con una cepa bacteriana estándar de colonias de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 obtenida del laboratorio Belomed, Lima, Perú.

Preparación de medios de cultivo y cepa bacteriana

a. Preparación del caldo BHI

- El caldo BHI fue preparado a partir del medio comercial deshidratado y acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Se vertió 2.8 ml en tubos de ensayo de 15 x 100mm.
- Inmediatamente después de autoclavar a 121°C, 15 libras de presión, por 15 minutos, se dejó enfriar.

b. Preparación del agar Schaedler enriquecido

- El agar Schaedler enriquecido fue preparado a partir del medio comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Inmediatamente después de autoclavar (121°C, 15 libras de presión, por 15 minutos) dejó enfriar en un baño de agua a 45 - 50° C.
- Se agregó sangre de cordero desfibrinada estéril en una proporción de 5% + 0,1ml de vitamina K1.
- Se vertió el preparado fresco y tibio a una placa de Petri de vidrio, de fondo plano en un nivel, superficie horizontal para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 25 - 30 ml para placas de Petri de 100 mm de diámetro.
- El medio de agar se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- Una muestra representativa de cada lote de placas se examinó para comprobar su esterilización mediante incubación a 35°C por 24 horas o más.
- El pH fue chequeado cuando el medio fue preparado. El agar con un pH de 7,2 después de gelificar a temperatura ambiente.

c. Cepa bacteriana para el estudio

Se trabajó con una cepa bacteriana estándar de colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) obtenida del laboratorio GenLab, Lima, Perú.

d. Reactivación de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)

- Se rehidrató la cepa liofilizada, rompiendo la ampolla conteniendo en el tubo original de goma.
- Se incubó durante 15 minutos a 36°C +1°C.
- Luego se sembró mediante técnica de agotamiento en placa de Petri con agar Schaedler enriquecido con sangre de carnero desfibrinada (5%) e incubado en condiciones de anaerobiosis (jarra de anaerobiosis) a 36°C +1°C, durante 4 a 7 días.
- 3 a 5 colonias fueron suspendidas en Tubo conteniendo Caldo BHI
- Después se observó la turbidez (crecimiento bacteriano) en el tubo conteniendo caldo BHI. Se incubó a 36°C + 1°C, durante 4 días.
- Después de la incubación, se procedió a la identificación de la cepa bacteriana.

e. Creación de ambiente anaerobio

Se procedió agregar uniformemente 30ml de agua destilada sobre una lámina de **Anaerocult A** de Merck, inmediatamente después se colocó dentro de una jarra de anaerobiosis, se cerró herméticamente y después de 30 minutos se consiguió un ambiente anaerobio dentro de la jarra.

Susceptibilidad *in vitro* a antibacterianos

a) Método: test de disco difusión en agar

El antibiograma basado en Kirby Bauer es un método recomendado por el **CLSI** (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria) para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibacterianos.

b) Estandarización del inóculo

- Se usó el método de suspensión directa de colonias y el estándar 0,5 de McFarland.
- Se tomó 3 a 5 colonias de *Porphyromonas gingivalis* del cultivo reciente realizado de 4 días y se suspendió en 4ml de caldo BHI, luego se incubó entre 2 a 5 horas, obteniendo una turbidez final de 0,5 de la escala de McFarland.

c) Preparación de los discos

Grupo experimental

- Grupo Problema: Las diferentes diluciones de Propóleo (5%, 10% y 15%).
- Grupo Control Positivo: Gluconato de Clorhexidina al 0,12%.
- Grupo Control Negativo: Alcohol etílico al 96° (Diluyente).

Impregnación de los discos:

- Se agregaron 20 μL de estos preparados o concentraciones, a discos de papel de filtro Whatman N° 3 (Oxford) de 6 mm de diámetro, con la ayuda de una micropipeta (marca Boeco) dejándolos por unos minutos hasta su completa absorción.

Evaluación de la actividad antibacteriana - Difusión en agar

- En un lapso de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) previamente estandarizado, se procedió a sumergir en ella un hisopo de dacrón estéril rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido, removiendo de esta manera el exceso de inóculo.
- Se inoculó la superficie de las placas de Petri conteniendo agar Schaedler enriquecido (de 4 mm de grosor) por rayado con el hisopo sobre toda la superficie en tres direcciones diferentes rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasó sobre los bordes del agar. Este procedimiento se realizó por 10 repeticiones.
- Inmediatamente se colocó los discos previamente impregnados: 03 discos con 3 concentraciones diferentes (5%; 10% y 15%) del extracto hidroalcohólico de propóleo. 01 disco conteniendo Gluconato de clorhexidina 0,12% (control positivo) y otro conteniendo alcohol etílico 96° (control negativo), distribuidos equidistantes sobre el agar. Cada disco fue presionado ligeramente para asegurar contacto pleno con la superficie del agar.
- Las placas fueron colocadas invertidas en ambiente anaeróbico (jarra de anaerobiosis) e Incubadas (en incubadoras Memmert) a 35°C durante 4 - 7 días.

Lectura e Interpretación:

- Luego de la incubación se procedió a la medición de cada halo inhibitorio correspondiente a cada disco de papel de filtro de las distintas diluciones o concentraciones, pasando por el centro del disco, con la ayuda del calibrador pie de rey. Los datos fueron registrados en el formato correspondiente. (Anexo 2).
- Se determinará el diámetro de inhibición obtenido a través de milímetros (mm).
- Cualquier medida de los halos de inhibición serán comparados con los halos que se formen con gluconato de clorhexidina 0.12% para comparar resistencia o susceptibilidad.

Método: test de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Método: Test de dilución en medio líquido

Según documento M11 del **CLSI** (Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria) que describe los estándares específicos para analizar anaerobios se utilizó procedimientos de CIM de macrodilución en caldo.

Preparación del inóculo: Cultivo puro.

Se tomó 3 a 5 colonias de *Porphyromonas gingivalis* del cultivo puro reciente y se suspendió en 6ml de caldo BHI, luego se incubó entre 2 a 5 horas, obteniendo una turbidez final de 0,5 de la escala de McFarland.

Evaluación de la actividad antibacteriana:

- Se procedió a preparar 06 tubos de ensayo (13 x 100mm) estériles.

- A los primeros 5 tubos (tubo N° 1, al Tubo N° 5) se le agregó 800 μL de cultivo puro de *Porphyromonas gingivalis*. Al tubo N° 6 se le agregó 1000 μL de cultivo puro de *Porphyromonas gingivalis*.
- **Grupo experimental:**
 - **Tubo N° 1:** se le agregó 200 μL de Extracto hidroalcohólico de Propóleo al 5%.
 - **Tubo N° 2:** se le agregó 200 μL de Extracto hidroalcohólico de Propóleo al 10%.
 - **Tubo N° 3:** se le agregó 200 μL de Extracto hidroalcohólico de Propóleo al 15%.
- **Control Positivo: Tubo N° 4,** se le agregó 200 μL de Gluconato de clorhexidina 0,12%.
- **Control Negativo: Tubo N° 5,** se le agregó 200 μL de alcohol etílico 96° (control negativo).
- **Control de crecimiento bacteriano: Tubo N° 6,** no se le agregó nada más que el cultivo puro.
- **Control de esterilidad: Tubo N° 7,** No se le agregó nada más que 1000 μL de caldo BHI estéril.
- El procedimiento se realizó por 10 repeticiones.
- Se incubó por 4 a 7 días en anaerobiosis (jarra de anaerobiosis) e incubadas (en incubadoras Memmert) a 35°C.

Lectura e interpretación

- Al término del periodo de incubación, se procedió a hacer la lectura, se observó el crecimiento bacteriano en cada uno de los tubos y se determinó la concentración mínima del extracto capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.
- Se consideró crecimiento bacteriano cuando el caldo se observó turbio y la ausencia de crecimiento bacteriano cuando el caldo permaneció claro. (Anexo 3).

3.8 Técnica de análisis de datos

Para analizar la información se construyeron tablas de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos, se calcularon valores resumen y se elaboraron tablas adecuadas para presentar los resultados de la investigación.

Para determinar el efecto del extracto etanólico del propóleo en la inhibición bacteriana de colonias de *Porphyromonas gingivalis* de la cepa (ATCC 32277) se realizó un análisis estadístico (ANOVA) para determinar si existen diferencias estadísticas entre las medias de los grupos. Con el objetivo de hallar donde se encuentran las diferencias estadísticas se procedió a realizar la prueba estadística de comparaciones múltiples post hoc de Tukey, ambas pruebas estadísticas considerando un nivel de significancia de 0.05. Se contó con el apoyo de una hoja de cálculo de Microsoft Excel y el programa estadística SPSS v 15,0.

3.9 Aspectos éticos de la investigación

En esta investigación se usó un derivado natural como lo es el propóleo, y colonias de *Porphyromonas gingivalis* de la cepa (ATCC 33277). No se incluyeron individuos

humanos o animales por lo que no son necesarias condiciones que protejan sus derechos. Además la cepa fue obtenida a través del laboratorio Belomed, el cual cuenta con el permiso requerido para la distribución de la cepa (ATCC 3327).

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*. Se emplearon 5 grupos compuestos por extracto etanólico de propóleo de Cajamarca al 5%, 10%, 15%, además de clorhexidina al 0,12% y alcohol al 96% como control positivo y negativo respectivamente, encontrándose los siguientes resultados:

El mayor diámetro de halo de inhibición se formó con el extracto etanólico de propóleo de Cajamarca al 15% con una media de 15.72 mm, seguido del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca al 10%, con 12.14 mm y finalmente el extracto al 5% con 9.73 mm. Por otra parte, en el grupo control, la clorhexidina al 0.12% y el alcohol al 96 % formaron un halo de inhibición de 16,79 mm y 6 mm respectivamente (Tabla 1a - gráfico 1).

En la comparación múltiple de extracto etanólico de propóleo de Cajamarca y el control positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%), el valor p fue de 0.00, en todos los grupos, excepto al comparar el grupo del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca al 15% con el control positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) en donde el valor p fue de 0.254 (Tabla 1b).

En la presente investigación se realizaron pruebas en concentraciones diferentes de extracto de propóleo de Cajamarca al 2.5%, 5%, 7%, 10%, 12.5% y 15%, no encontrándose crecimiento de la cepa *Porphyromonas gingivalis*, en ninguna de las concentraciones; por tanto, la concentración mínima inhibitoria fue de 2.5% (Tabla 2-gráfico 2).

Tabla 1a. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)

Grupos	n	Media	Mediana	Moda	D.S	Mínimo	Máximo	p*
E.E Propóleo 5%	10	9,730	9,750	9,7	0,3561	9,1	10,3	0,00
E.E Propóleo 10%	10	12,140	12,550	10,2	1,4729	10,2	14,1	
E.E Propóleo 15%	10	15,720	16,050	14,1	1,4474	13,8	17,5	
Clorhexidina 0.12%	10	16,790	16,300	15,2	1,5300	15,2	19,4	
Alcohol 96%	10	6,000	6,000	6,0	0,0000	6,0	6,0	

Kolmogorov-Smirnov (p 0.377)

Significancia (p < 0,05)

* Anova de un factor.

Gráfico 1. Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonia de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)

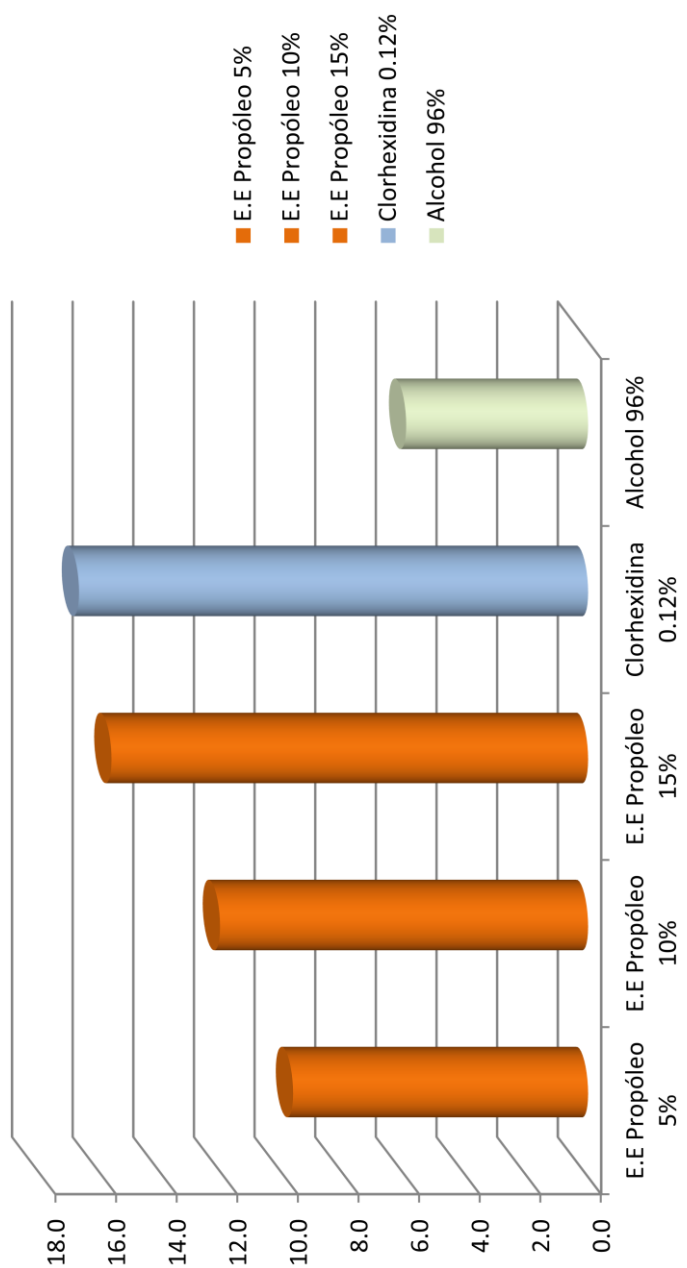


Tabla 1b. Comparaciones múltiples pos hoc para determinar significancias entre grupos

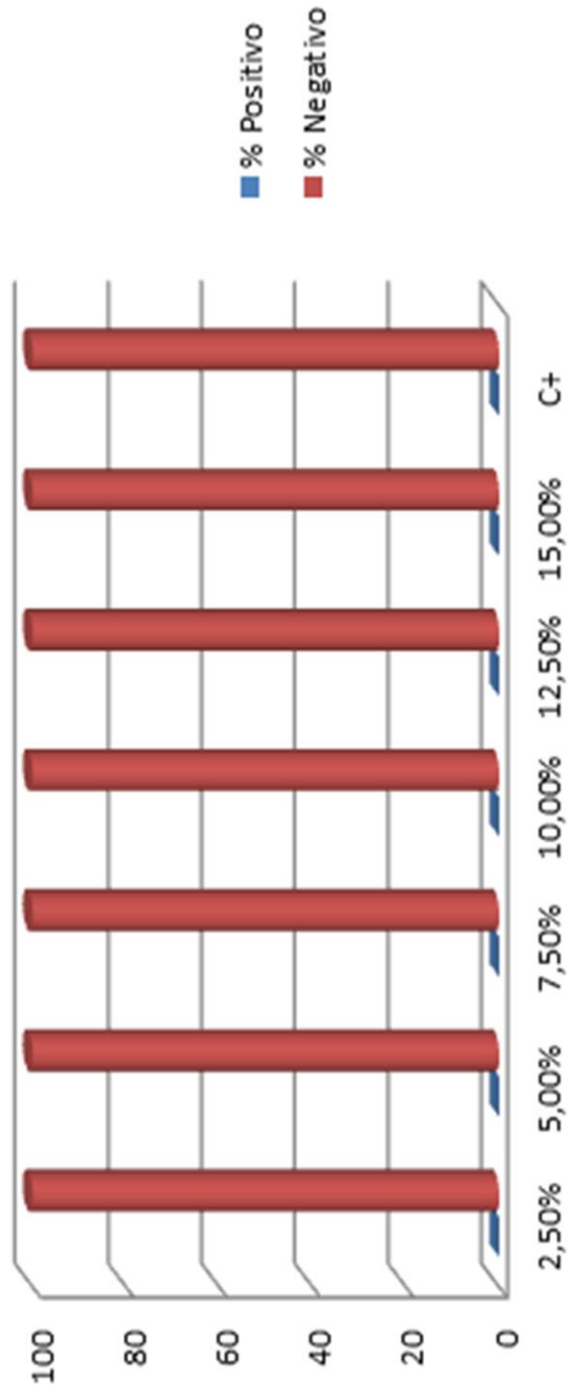
Grupos	C. Propóleo 5%	C. Propóleo 10%	C. Propóleo 15%
E.E Propóleo 5%	-----	0,000	0,000
E.E Propóleo 10%	0,000	-----	0,000
E.E Propóleo 15%	0,000	0,000	-----
Clorhexidina 0.12%	0,000	0,000	0,254
Alcohol 96%	0,000	0,000	0,000

Significancia (p < 0,05)

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)

Concentración	n	% Positivo	% Negativo
2,50%	10	0	100
5,00%	10	0	100
7,50%	10	0	100
10,00%	10	0	100
12,50%	10	0	100
15,00%	10	0	100
C+	10	0	100
Cc	10	100	0
Ce	10	0	100

Gráfico 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca sobre colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277)



4.2 Discusión

La enfermedad periodontal es una de las patologías más frecuentes en la cavidad oral, por ello, es de vital importancia indagar sobre nuevas alternativas terapéuticas que ayuden a combatirla.

La presente investigación tuvo como objetivo estudiar una alternativa natural, como lo es el propóleo de Cajamarca, frente a uno de los microorganismos más periodontopatógenos presentes en la periodontitis, la *Porphyromonas gingivalis*. Los resultados obtenidos en el este estudio mostraron que el extracto etanólico de propóleo de Cajamarca posee eficacia antibacteriana frente a dicha bacteria; esto coincide con los resultados de los autores citados anteriormente, tales como, Speranca¹², Calderón¹³, Koo *et al.*¹⁴, Rodríguez¹⁵, Reyes¹⁶, Díaz y Proaño¹⁷, Agarwal G, Vemanaradhya G y Mehta D.¹⁸ y Koru *et al.*¹¹ Sin embargo el último autor nombrado, encontró que el extracto etanólico de propóleo presenta eficacia antimicrobiana frente a *Porphyromonas gingivalis*, pero es más efectivo para bacterias anaerobias Gram positivas.

En el estudio, al realizar el análisis de metabolitos secundarios, se evidenció que dicho propóleo presenta mayor cantidad de lactonas en comparación a los estudios realizados con propóleos de otras regiones, como Piura, Ayacucho y Pucallpa.¹⁰ Las lactonas, son compuestos orgánicos del tipo éster cíclico, responsables de brindar diferentes actividades biológicas tales como antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria, antibacteriana, anticancerígena, antiviral, antifúngica, así como su potencia antialérgica.⁵⁴ Esta variación de componentes se debe a que Cajamarca

posee una flora diferente a la de otros lugares, la cual sirve a las abejas como fuente de alimento y materia prima para elaborar el propóleo, además que en el caserío de Huambocancha Chica de donde se obtuvo este, existe una mínima contaminación por ser un sitio alejado del centro de la ciudad de Cajamarca.

Con respecto a las concentraciones del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca, tanto al 5%, 10% y 15%, se encontró actividad antibacteriana sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* mostrando una diferencia significativa entre los grupos, resultados que coinciden con el estudio de Díaz y Proaño¹⁷ quienes empleando el método de difusión en agar, trabajaron con concentraciones de 5% y 10% obteniendo diferencia significativa entre ambas.

Por otro lado, se encontró que hubo diferencia estadísticamente significativa entre la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca al 5% y 10% comparados con gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*; siendo mejor el gluconato de clorhexidina al 0.12%, resultados que coinciden con el estudio de Speranca¹² quién también encontró diferencia significativa en las mismas concentraciones; esto probablemente se deba a las bajas concentraciones de extracto etanólico de propóleo empleadas. Sin embargo, discrepan con el estudio de Díaz y Proaño¹⁷ quienes al emplear extracto etanólico de Oxapampa, no encontraron diferencia estadísticamente significativa de extracto de propóleo a una concentración de 10% comparado con gluconato de clorhexidina al 0.2%, encontrando que la actividad antibacteriana de dicho propóleo a una baja

concentración es comparable con la actividad de la clorhexidina con concentración incluso superior a la empleada en el presente estudio.

Así también, en nuestro trabajo, la concentración de extracto etanólico de propóleo al 15% no mostró diferencia significativa al ser comparado con gluconato de clorhexidina al 0.12%, siendo, además, la concentración que presentó mayor inhibición frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis*. El resultado obtenido discrepa con los resultados de Speranca¹² quien no encontró diferencia estadísticamente significativa a partir de una concentración de 30%, esto posiblemente, porque dicho autor trabajó con un disolvente diferente al realizar el extracto, pues en su estudio se empleó extracto acuoso más no etanólico. No obstante, mientras menor sea la concentración empleada de propóleo, se podrían evitar posibles efectos de toxicidad en los pacientes, siendo esto favorable en nuestra investigación, ya que basta una concentración de 15% de extracto etanólico de propóleo de Cajamarca, para ser comparable con la actividad antibacteriana de la clorhexidina, ya que como se sabe, pese a que el propóleo es un producto que por ser natural reduce los efectos colaterales, empleado a una alta concentración podría presentar reacciones no deseadas, como mucositis oral y dermatitis de contacto, tal como lo refiere Basista⁴⁴, quien en su estudio encontró un caso atípico de dermatitis simultánea por contacto aéreo y directo en un apicultor de la región de Małopolska, Polonia, en donde concluye que el propóleo debe considerarse como un alérgeno de contacto importante.

En relación a la concentración mínima inhibitoria, según los resultados obtenidos en el estudio, fueron negativos en su totalidad, es decir, no hubo crecimiento de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* en ninguna concentración analizada. La mínima concentración inhibitoria de extracto etanólico de propóleo de Cajamarca en el estudio fue 2.5%, este resultado es similar a la investigación realizada por Agarwal G, Vemanaradhya G y Mehta D,¹⁸ quienes encontraron una concentración mínima inhibitoria de extracto de propoleo chino en el 1%, lo que sugiere que el uso del propóleo a bajas concentraciones puede ser una alternativa natural, efectiva y con menos efectos colaterales para los pacientes, además de ser un producto de bajo costo y fácil acceso.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El extracto etanólico de propóleo de Cajamarca posee efecto antibacteriano frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*.
2. Las colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) son más susceptibles al extracto etanólico de propóleo de Cajamarca en concentración de 15% *in vitro*.
3. La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca fue de 2.5% frente a colonias de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) *in vitro*.

5.2. Recomendaciones

1. Realizar estudios comparando propóleo de diferentes regiones, ya que las propiedades pueden variar por la zona, clima, humedad, contaminación, flora, entre otros factores.
2. Realizar estudios para evaluar los efectos citotóxicos de los componentes que posee el propóleo de Cajamarca, así como determinar el porcentaje adecuado para un estudio clínico.
3. Realizar estudios clínicos en animales para determinar la efectividad antibacteriana del propóleo de Cajamarca.
4. Realizar estudios complementarios del propóleo de Cajamarca frente a otros antisépticos orales.

7. REFERENCIAS

1. Shkiar G y Carranza F. Antecedentes Históricos de la periodontología.: Editorial Medica Ripano, 2010;(1):214.
2. MINSA [Internet]. Perú: Dirección General de Salud de las Personas; c2001-2002 [actualizado 18 may 2017; citado 11 set 2017]. Prevención para la salud. Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/index.asp?op=2#Prevenci%C3%B3n para la Salud>.
3. Brunner J, Scheres N, Idrissi N, Deng D, Laine M, Winkelhoff A, *et al.* The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. Rev. BMC Microbiol [Publicación periódica en línea] 2010. [citado 14 nov 2017]; 10(1):[5pp.]. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186>.
4. Ramos D, Amezaga G. *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. Rev. Odontológica San Marquina, 2010; 14(1):34–8.
5. Gjermo P. Chlorhexidine in dental practice. Ver. Journal clinical periodontol, 2009;(12):55.
6. Del Río P. Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio *in vitro*. [Tesis para título de cirujano dentista]. Chile: Universidad de Chile Facultad de Odontología Departamento de Patología Área de Microbiología; 2006.
7. Montenegro A y Ramos D. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre *Porphyromonas gingivalis*. Rev. Odontol San Marquina, May 2016; 19(1):7-11.

8. Morimi H, Martinez E y Ramos P. Antibacterianos naturales orales: Estudio en la Facultad de Odontología de la Universidad Mayor de San Marcos. Rev. Odontol San Marquina, 2009; pp.25–8.
9. Vicuña E. Las Podocarpáceas de los bosques montanos del noroccidente peruano. Rev. Peruana Biología Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM, 2005;12(2):283-288.
10. Soto M. Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. Rev. In Crescendo. Institucional, 2015; 6(2): 22-32.
11. Koru O, Toksoy F, Acikel H, Tunca M, Baysallar M, Uskudar A, et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Rev. Anaerobe, 2007;13(3–4):140.
12. Speranca P, Maia L, Toscano T y Florencio W. Verificacao da atividade antimicrobiana de solucoes a base de própolis, sobre microbiota oriunda de bolsas periodontais estudo *in vitro*. Rev. de Periodontia, 2007; 17(3):54-59.
13. Calderon D. Actividad antibacteriana *in vitro* de soluciones de propóleo etanólico sobre dos bacterias periodontopatogenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal. Hospital Militar Central, Lima 2010 [Tesis para título de cirujano dentista]. Lima: Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Odontologia; 2010.
14. Koo H, Gomes B, Rosalen P, Ambrosano B, Park K y Cury A. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Rev. International Journal of Drug Development and Research, 2010;45(2):141–8.

15. Rodríguez M. Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar con reacción periapical. [Tesis para título de cirujano dentista]. Lima: Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Odontología; 2010.
16. Reyes C. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico del propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica [Tesis para título de cirujano dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Odontología; 2010.
17. Días J y Proaño D. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Rev. Estomatológica Herediana, 2011;21(3):125-130.
18. Agarwal G, Vemanaradhya G y Mehta D. Evaluation of chemical composition and efficacy of Chinese propolis extract on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An *in vitro* study. Contemp Clin Dent, 2012;3(3):256.
19. Escudero N, Perea M y Bascones A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. Rev. Periodon Implantol, 2008; 20(1): 27-37.
20. Rojas A y Pastor J. Informe de casos clínicos en periodoncia. Rev. Periodon Implantol, 2004;10(1):5.
21. Echeverría J. Enfermedades periodontales V periimplantarias . Factores de riesgo V su diagnóstico. Rev. Periodon Implant, 2003;15(3):49-56.
22. Bascones A., Figueroa E. Las enfermedades periodontales como infecciones

bacterianas. Rev. Periodoncia e Implantol Oral, 2005;17(3):47–56.

23. Yilmaz O. The chronicles of *Porphyromona gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. NIH Microbiology [Publicación periódica en línea] 2008. [citado 11 nov 2017]; 154(10): 2897-2903. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832296>.

24. Darveau RP. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. DNA Cell Biol [Publicación periódica en línea] 2009. [citado 11 nov 2017]; 28(8): 389- 395. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2883565/>.

25. Duncan M, Nakao S, Skobe Z y Xie H. Interactions of *Porphyromona gingivalis* with epithelial cells. Infect Immun [Publicación periódica en línea] 2009. [citado 14 nov 2017]; 28(9): 389- 392. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8386706>.

26. Jotwani R y Cutler W. Adult periodontitis – specific bacterial infection or chronic inflammation J. Med. Microbiol [Publicación periódica en línea]. 2012 [citado 14 nov 2017]; 47: 187-188. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511822>.

27. Scannapieco FA. Pneumonia in nonambulatory patients the role of oral bacteria and oral hygiene. J. Am. Dent. Assoc [Publicación periódica en línea] 2006. [citado 14 nov 2017] ; 137: 219- 255. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012732>.

28. Souccar N, Chakhtoura M, Ghafari J, Abdelnoor A. *Porphyromona gingivalis* in dental plaque and serum creactive protein levels in pregnancy. Infect Dev Ctries

[Publicación periódica en línea] 2010. [citado 14 nov 2017]; 4(6): 362-366.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20601787>.

29. Van T. Resolution of inflammation- unraveling mechanistic links between periodontitis and cardiovascular disease. *J. Dent.* [Publicación periódica en línea] 2009. [citado 14 nov 2017]; 37(8): 582-583. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501948>.

30. Bascones A, Mudarra S, Perea E. Antisépticos en el tratamiento de la enfermedad periodontal. *Rev Periodoncia e Implantol Oral.* [Publicación periódica en línea] 2002. [citado 14 nov 2017];14(3):101–14. Disponible en:

http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S16996585200200030.

31. Sánchez L y Sáenz E. Antisépticos y desinfectantes. *Enfermedades Infecciones y Microbiología. Rev. Dergatología peruana*, 2005;15(2):90.

32. Vademécum [Internet]. Perú 2002 [actualizado 20 jul 2016; citado 16 nov 2017]. Osfatun. Disponible en: <http://osfatun.com.ar/Vademecum.pdf>.

33. De la Cruz M, Torres L, Díaz M, Acosta A. La clorhexidina, bases ectructurales y aplicación en la estomatología. *Rev. Gaceta médica espirituana*, 2009;10(4): 457-64.

34. Evans S, Cowan M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Cosmet Sci Technol Ser* [Publicación periódica en línea] 2006. [citado 16 nov 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515903>.

35. Sánchez S, Vasquez C. Zonas de vida de Cajamarca [Internet]. Perú: Biodiversidad; 2011 [citado 11 de oct 2017]. Disponible en:

<http://zeeot.regioncajamarca.gob.pe/sites/default/files/ZonasVidasZEESegunMapaNa>

cional.pdf.

36. Felitti R. Propóleo en Odontología . Usos y aplicaciones. Actas odontológicas [Publicación periódica en línea] 2014. [citado 14 de oct 2017];11(1): [30–37p.].

Disponible en: <http://studylib.es/doc/7346800/prop%C3%B3leo-en-odontolog%C3%ADa.-usos-y-aplicaciones>.

37. Perez C, Arquillue A, Fuencisla J, El propoleo de las abejas. Rev. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. España, 1986;(7): 1-11.

38. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Rev. Ars Pharmaceutica México[Publicación periódica en línea] 2002. [citado 16 nov 2017]; 10(4):[7-14p.].

Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/233.pdf>.

39. Jin U, Chung T, Kang S, Suh S, Kim J, Chung K, et al. Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase and invasion inhibitor: isolation and identification. Clin Chim Acta. [Publicación periódica en línea] 2005.

[citado 20 nov 2017]; 362(1-2): 57-64. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16004979>.

40. Fajuri M, Huerta J, Silva N. Eficacia del propóleo chileno como antimicrobiano contra microorganismos de interés en Odontología. [Tesis para título de cirujano dentista] Chile: Universidad de Chile Facultad de Odontología;2004.

41. Dias L, Pereira A, Estevinho L. Comparative study of different Portuguese samples of propolis: Pollinic, sensorial, physicochemical, microbiological characterization and antibacterial activity. Food Chem Toxicol [Publicación periódica en línea] 2012. . [citado 16 nov 2017]; 50(12):[50–53p.]. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22981908>.

42. Damasceno H, Novelli E, Martins E, Sforcin J. Propolis: Effect of different concentrations. *Ethnopharmacol* [Publicación periódica en línea]2006. [citado 20 nov 2017]; 105(1–2):5–8. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293383>.

43. Almas K, Dahlan A, Mahmoud A. Propolis as a natural remedy: An update. *Saudi Dent* [Publicación periódica en línea] 2011. [citado 20 nov 2017]; 13(1): 45-49. Disponible en: http://zfn.mpdl.mpg.de/xtf/data/Reihe_C/53/ZNC-1998-53c-1045.pdf

44. Basista K. Direct and airborne contact dermatitis in a beekeeper from the Małopolska region. *Rev. International journal of occupational medicine and environmental health*, 2012;25(4):499-500. 45.

45. Hay K y Greig D. Propolis allergy: A cause of oral mucositis with ulceration. *Rev. Explore Plum Metrics*, 2010; 70(5):584-586.

46. Bruschi M, Jones D, Panzeri H, Gremião M, de Freitas O, Lara E. Semisolid systems containing propolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural and mucoadhesive properties, *J Pharma Sci* [Publicación periódica en línea] 2007. [citado 20 nov 2017]; 96(8): 2074-2089. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17301966>.

47. Ozan F, Polat Z, Er K, Ozan U, Değer O. Effect of propolis with in wool patches. *J Endod* [Publicación periódica en línea]2007. [citado 20 nov 2017]; 33(5): 570-573. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17437874>.

48. Topcuoglu N, Ozan F, Ozyurt M y Kulekci G. *In vitro* antibacterial effects of glass-ionomer cement containing ethanolic extract of propolis on *Streptococcus*

- mutans*. Eur J Dent [Publicación periódica en línea] 2012. [citado 20 nov 2017]; 6(4): 428-433. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3474559/>.
49. Ramos I, Biz M, Paulino N, Scremin A, Della A, Barletta F, *et al.* Histopathological analysis of corticosteroid-antibiotic preparation and propolis paste formulation as intracanal medication after pulpotomy: an *in vivo* study. J Appl Oral Sci [Publicación periódica en línea] 2012. [citado 20 nov 2017]; 20(1): 50-56. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167877572012000100010&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
50. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V y Shimizu M. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. Mycoses. [Publicación periódica en línea] 2001. [citado 20 nov 2017]; 44(9-10): 375-378. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11766101>.
51. Rojas C. Actividad antagónica de Propóleos Cajamarquinos Frente a: *Cercospora sp.*, *Alternaria sp.* y *Oidium sp.* en condiciones *in vitro*. [Tesis para título de ingeniero agrónomo] Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca. Facultad de Agronomía. 2014.
52. Miranda M. Métodos de análisis de drogas y extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. Cuba. 2002.
53. Lock, O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. PUCP, Lima, Perú. 1994;2.
54. Ruiz E y Suarez M. Lactonas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Rev. Cenic, 2015;46(1):1-5.

LISTA DE ABREVIACIONES

ATCC: American Type Culture Collection.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

UPAGU: Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.

GLOSARIO

Efecto antibacteriano. Capacidad para producir el efecto antibacteriano deseado que actúa en impedir el crecimiento o eliminación de colonias, en este caso

Porphyromonas gingivalis.

Porphyromonas gingivalis. Gram negativo, anaerobio estricto que aprovecha las condiciones que da el huésped para generar mayor daño.

Propóleo. Sustancia natural parecida a una resina pegajosa que las abejas obtienen de las resinas de la corteza de ciertos árboles.

ANEXOS

ANEXO 1

METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYOS	RESULTADO
Catequinas	Na ₂ CO ₃ + Luz UV	+
Lactonas	Baljet	++
Triterpenos y Esteroides	Liebermann Burchard -	+
Quinonas	Bornträger	+
Saponinas	Espuma	-
Compuestos fenólicos	Cloruro Férrico	+++
Flavonoides	Shinoda	+
Antocianidina	Antocianidinas	+
Taninos	Gelatina	+
Cardenólicos	Kedde	-
Alcaloides	Dragendorff	-
	Mayer	-
	Wagner	-

Leyenda:

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

Intensidad: + Baja

++ Moderada

+++ Alta

ANEXO 2

INSTRUMENTO DE MEDICIÓN DE DATOS (PIE DE REY) – FICHAS DE CONTROL, PARA SUSCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA.

CC	DISCO	GRUPOS DE REPETICIONES EN PLACAS									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
5%	1										
10%	2										
15%	3										
C+	4										
C-	5										

Diámetro de inhibición: mm

ANEXO 3

INSTRUMENTO DE MEDICIÓN DE DATOS– FICHAS DE CONTROL, PARA CMI.

CC	GRUPO DE REPETICIONES EN TUBOS									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
2.5%										
5%										
7.5%										
10%										
12.5%										
15%										
C+										
C-										
C.E.										

(+): Crecimiento bacteriano.
 (-) : Ausencia de crecimiento bacteriano.
 C.E.: Control de esterilidad.

ANEXO 4

PROTOCOLO DE TRABAJO

Imagen 1. Obtención del extracto etanólico de propóleo de Cajamarca.



Recolección de propóleo.

Imagen 2. Preparación del extracto etanólico del propóleo de Cajamarca.



Propóleo colocado en refrigeración a 0° C por 24 h.



Pesando el propóleo.



Trituración del propóleo en un mortero.



Propóleo en polvo.



Colocando 30 gr de propóleo en polvo en un frasco más 100 ml. de etanol de 96°, llevando a extraer con agitación a 48 hrs.



Filtración del extracto etanólico de propóleo con papel de filtro Whatman n° 40.



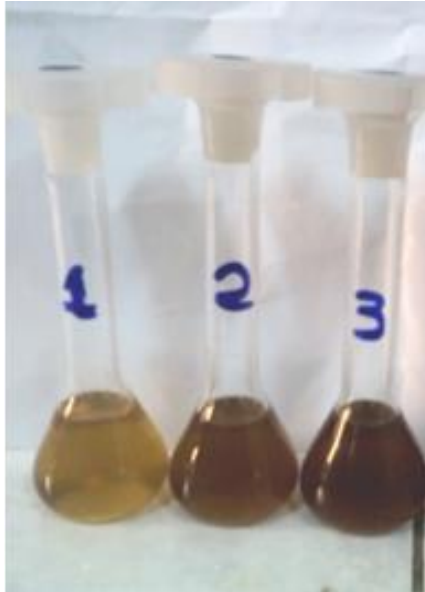
Extracto etanólico de propóleo filtrado.



Evaporación del solvente del extracto etanólico de propóleo en el rotavaporador.



Extracto etanólico seco de propóleo.

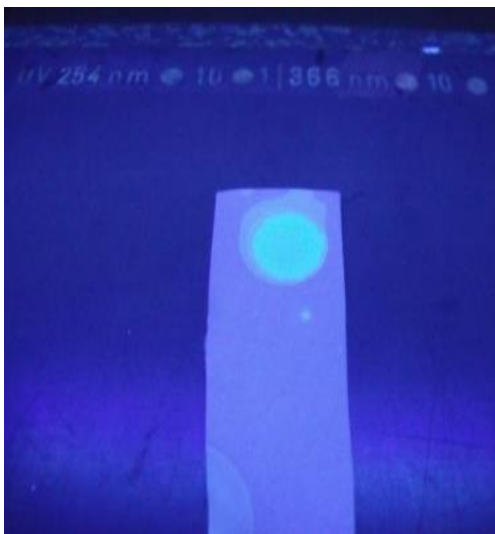


Preparación de los extractos etanólicos de propóleo en una fiola de 10 ml. **1.** 5%, **2.** 10% y **3.** 15%.



Extractos etanólicos de propóleo colocados en frascos de vidrio de color ámbar de concentraciones de 5%, 10% y 15%, listos para ser ensayados.

Imagen 3. Reacciones químicas de la deteminación de metabolitos secundarios del extracto etanólico del propóleo.



Catequinas.
Reacción (+).
Mancha verde carmelita a la luz UV.



Lactonas.
Reacción (++)
Coloración roja.



Triterpenos y esteroides.
Reacción (+).
Coloración azul verdoso.



Quinonas.
Reacción (+).
Coloración rosada.



Saponinas.
Reacción (-).
No hay formación de espuma.



Compuestos fenólicos.
Reacción (+++) Coloración verde oscuro.



Flavonoides.
Reacción (+).
Coloración amarilla en la fase amfílica.



Antocianidina.
Reacción (+).
Coloración roja en la fase amfílica.



Taninos.
Reacción (+).
Precipitado blanco.

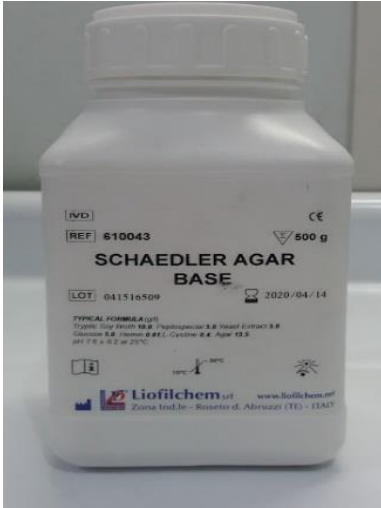


Glicósidos cardiotónicos.
Reacción (-).
No hay coloración violácea.

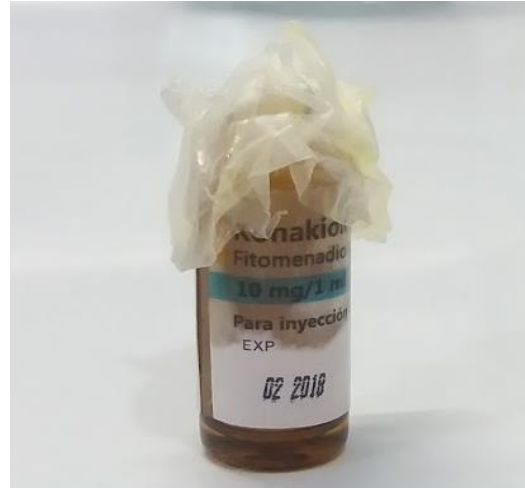


Alcaloides.
Ensayo de Mayer.
Reacción (-).
No hay formación de precipitado blanco.

Imagen 4. Preparación de caldo BHI y agar sangre.



Agar Schaedler.

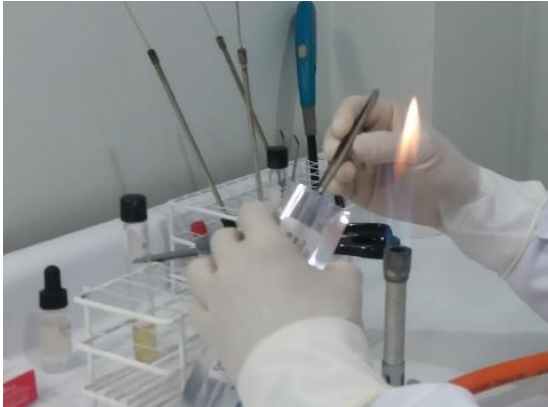


Vitamina K para enriquecer agar sangre.



Agar sangre.

Imagen 5. Activación de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277).



Sobre de la cepa de
Porphyromonas gingivalis



Activación con 2ml de caldo
BHI.



Técnica de agotamiento en placa Petri.



Incubación a 36.5° por 4 días.



Placas en ambiente anaeróbico.

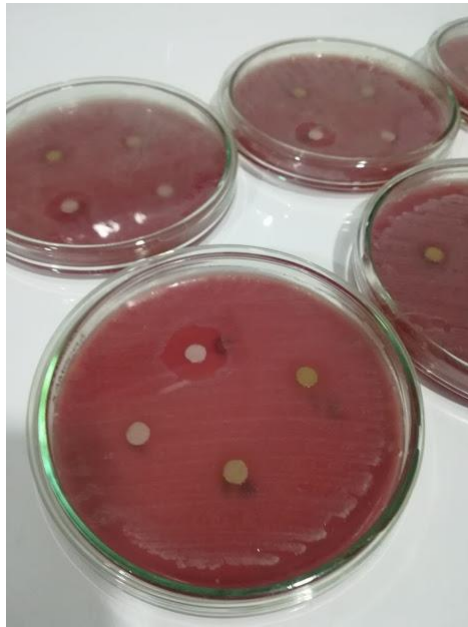
Imagen 6. Susceptibilidad *in vitro* a antibacterianos.



Colocación de discos previamente impregnados con extracto 5, 10 y 15%.



Control de esterilidad.



Repetición de pruebas.

Imagen 7. Lectura e interpretación.



Demarcación de halos.



Medición con pie de rey.

Imagen 8. Prueba de turbidez para CMI.

