

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



Facultad de Ciencias de la Salud

“Dr. Wilman Ruiz Vigo”

Carrera Profesional de Estomatología

**INHIBICIÓN BACTERIANA ENTRE EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE PROPÓLEO AL 30% E
HIDRÓXIDO DE CALCIO EN COLONIAS DE *Enterococcus
faecalis* (ATCC 29212) in vitro.**

Autor:

Bach. Marcial Enrique González Rojas

Asesora:

C.D. Esp. Jenifer Chipana Buiza

Coasesor:

Mg. Q.F. Rafael Tejada Rossi

Cajamarca-Perú

Abril – 2018

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



Facultad de Ciencias de la Salud

“Dr. Wilman Ruiz Vigo”

Carrera Profesional de Estomatología

**INHIBICIÓN BACTERIANA ENTRE EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE PROPÓLEO AL 30% E
HIDRÓXIDO DE CALCIO EN COLONIAS DE *Enterococcus
faecalis* (ATCC 29212) in vitro.**

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

Bach. Marcial Enrique González Rojas

Asesora: C.D. Esp. Jenifer Chipana Buiza

Coasesor: Mg. Q.F. Rafael Tejada Rossi

**Cajamarca-Perú
Abril – 2018**

COPYRIGHT © 2018 by
MARCIAL ENRIQUE GONZÁLEZ ROJAS

Todos los derechos reservados

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO:

De conformidad con el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, someto a su evaluación y elevado criterio profesional la tesis intitulada:

Inhibición bacteriana entre extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en colonias de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Con la cual aspiro obtener el Título Profesional de Cirujano Dentista.

Es propicia esta oportunidad para manifestar mi sincero reconocimiento a mi Alma Máter y a toda su plana docente, que con su capacidad y buena voluntad contribuyeron a mi formación profesional.

Señores miembros del jurado, dejo a su disposición la presente tesis para su evaluación y sugerencias.

Cajamarca, Abril del 2018

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUIZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

APROBACIÓN DE TESIS PARA OPTAR TÍTULO

PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

**INHIBICIÓN BACTERIANA ENTRE EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE PROPÓLEO AL 30% E HIDRÓXIDO DE
CALCIO EN COLONIAS DE *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.**

JURADO EVALUADOR

Esp. C.D. Jeisson Bernaola Medina
PRESIDENTE

Mg. Blgo. Jorge Bazán Mayra
MIEMBRO

Esp. C.D. Jenifer Chipana Buiza
MIEMBRO

A:

A Dios, por regalarme la vida, salud, darme sus bendiciones y no dejarme solo jamás.

A mis padres Marcial y Emperatriz, por haberme dado su apoyo incondicional, por haberme dado todo su amor a cada momento de mi vida, por enseñarme a luchar por mis sueños.

A mis amados abuelos Manuel y Georgina, por enseñarme siempre a ser una mejor persona, a tener valores y cuidar siempre de mí como mis segundos padres.

La memoria de mis amados abuelos Marcial y Dalila, por ser mis ángeles, que me dieron todo su amor en vida, me cuidan y guían desde el cielo día a día.

Mi amada hermana Angela y mi querido cuñado Carlos, por siempre animarme a superar cada reto y obstáculo, por quererme y confiar en mí así como yo en ellos.

Mi sobrina ahijada Angela Emilia, por darme muchísima alegría, ternura e inocencia.

Marcial Enrique González Rojas

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme salud para seguir adelante y nunca dejarme solo

A mi asesora Esp. C.D. Jenifer Chipana Buiza, por su ayuda desinteresada en la realización de la presente tesis. Por dedicar parte de su tiempo a apoyarme con mi tesis.

A mi coasesor Mg. Q.F. Rafael Tejada Rossi, por su apoyo y colaboración en la elaboración de mi tesis.

A la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, por facilitarme sus instalaciones en la ejecución de la presente investigación.

A todas las personas que a lo largo de mi carrera me brindaron su cariño y apoyo.

Marcial Enrique González Rojas.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro. Se determinó el efecto antibacteriano mediante inhibición bacteriana, por método del pocillo, del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Del propóleo procedente de Cajamarca, se obtuvo un extracto hidroalcohólico al 30%. El hidróxido de calcio (Ultracal XS) presentación comercial. Se procedió a colocar 40 uL de extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% y 40 uL de hidróxido de calcio en cada pocillo de 4 mm de diámetro en placas de Petri de agar Müller Hinton, incubándose a 35°C durante 24 horas. Se realizaron 20 repeticiones, control de esterilidad del medio y control de crecimiento bacteriano. Finalmente se midieron los halos de inhibición, obteniendo una media de 10.6 mm para el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% y 22.2 mm para el hidróxido de calcio.

Se obtuvo mediante la prueba no paramétrica: U de Mann Whitney una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$) entre grupo control y grupo problema. En base a la evidencia mostrada se concluye que, el hidróxido de calcio presenta mayor efecto antibacteriano en comparación con el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Palabras clave: Inhibición bacteriana, extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%, hidróxido de calcio.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the antibacterial effect of the hydroalcoholic extract of 30% propolis and calcium hydroxide in the *Enterococcus faecalis* strain (ATCC 29212) in vitro. The antibacterial effect was determined by bacterial inhibition, by the well method, of the hydroalcoholic extract of 30% propolis and calcium hydroxide in the *Enterococcus faecalis* strain (ATCC 29212).

From propolis of Cajamarca, a 30% hydroalcoholic extract was obtained. Calcium hydroxide (Ultracal XS) commercial presentation. 40 uL of 30% propolis hydroalcoholic extract and 40 uL of calcium hydroxide were placed in each 4 mm diameter well in Müeller Hinton agar Petri dishes, and incubated at 35 ° C for 24 hours. Twenty repetitions were performed, control of sterility of the medium and control of bacterial growth. Finally, the inhibition zones were measured, obtaining an average of 10.6 mm for the hydroalcoholic extract of propolis at 30% and 22.2 mm for calcium hydroxide.

A non-parametric test was obtained by Mann Whitney U: a statistically significant difference ($p = 0.000$) between the control group and the problem group. Based on the evidence shown, it is concluded that calcium hydroxide has a greater antibacterial effect compared to the hydroalcoholic extract of 30% propolis in *Enterococcus faecalis* strain (ATCC 29212) in vitro.

Key words: Bacterial inhibition, hydroalcoholic extract of 30% propolis, calcium hydroxide.

CONTENIDO

PRESENTACIÓN.....	III
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	VIII
CONTENIDO	IX
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE GRÁFICOS	XII
LISTA DE FOTOS	XIII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II: MARCO CONCEPTUAL	3
2.1. Antecedentes de la investigación.....	3
2.2. Propóleo.....	6
2.3. Hidróxido de calcio	9
2.4. <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).....	11
2.5. Definición de términos básicos.....	12
CAPÍTULO III: MÉTODOS.....	14
3.1. Tipo de investigación.....	14
3.2. Operacionalización de variables:.....	14
3.3. Población.....	15

3.4. Diseño de contrastación de la hipótesis.....	15
3.5. Técnicas de recolección de datos.....	16
3.6. Instrumento de recolección de datos.....	16
3.7. Técnica de análisis de datos.....	16
3.8. Consideraciones éticas.....	16
3.9. Recursos.....	17
3.10. Proceso.....	19
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	27
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	31
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
REFERENCIAS.....	39
ANEXOS.....	46
ANEXO 1: INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	46
ANEXO 2: PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO.....	49
ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
ANEXO 4: REGISTROS FOTOGRÁFICOS.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Resultados de la medición de halos de inhibición entre el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) in vitro.....	28
Tabla 2: Media, mediana, moda, rangos y desviación estándar del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) in vitro.....	29
Tabla 3: Estadísticos descriptivos de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) in vitro.....	30
Tabla 4: Prueba de U de Mann-Whitney y estadísticos descriptivos de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) in vitro.....	48
Tabla 5: Pruebas de normalidad y estadísticos descriptivos de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) in vitro.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) in vitro.....	30
---	----

LISTA DE FOTOS

Foto 1: Recolección propóleo en la apícola “RH&HD” en Cajamarca.....	49
Foto 2: 70 gramos de propóleo en estado puro usados para el extracto hidroalcohólico	49
Foto 3: Esterilización del instrumental a usar para la ejecución de la tesis.....	50
Foto 4: 30 gramos de propóleo usados pesados en la balanza electrónica A&D Company®.....	50
Foto 5: Realización de pedazos más pequeños del propóleo para su correcta colocación en el matraz	51
Foto 6: Se adicionaron 100 mL de alcohol de 70° a los 30 gramos de propóleo en el matraz para colocarlo en el agitador magnético.....	51
Foto 7: El extracto ya en agitación, fue dejado por 24 horas y se le colocó papel metálico para protegerlo de la luz y evitar la desnaturalización del mismo	51
Foto 8: Pasadas 24 horas se realizó el filtrado, con el embudo y gasas estériles, hacia el frasco color ámbar	52
Foto 9: El extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% rotulado	52
Foto 10: Preparación del caldo Mueller Hinton	53
Foto 11: Cepa <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).....	53
Foto 12: Siembra de la cepa <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).....	54

Foto 13: Reactivación de la cepa <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).....	54
Foto 14: El agar Müeller-Hinton siendo pesado en la balanza electrónica A&D Company®.....	55
Foto 15: El agar Müeller-Hinton en los tres matraces puestos en autoclave	55
Foto 16: El medio repartido en placas de Petri estériles	56
Foto 17: Control de esterilidad y control de crecimiento bacteriano de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212).....	56
Foto 18: Realización de pocillos	57
Foto 19: Inoculación de la cepa <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) en el agar Müeller Hinton	57
Foto 20: Extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% y el hidróxido de calcio (Ultracal XS).....	58
Foto 21: Colocación de extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio (Ultracal XS) en los pocillos	58
Foto 22: Placas de Petri puestas en la incubadora Memmert® a 35°C ± 1°C durante 24 horas	59
Foto 23: Halo de inhibición producido por el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%.....	59
Foto 24: Halo de inhibición producido por el hidróxido de calcio (Ultracal XS)..	60
Foto 25: Halos de inhibición formados en las placas de Petri	60

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

En la práctica odontológica en el área de endodoncia uno de los pasos más importantes de la terapia endodóntica es la reducción de colonias bacterianas y sus productos del interior de los conductos radiculares, los cuales son considerados agentes etiológicos principales de los estados de necrosis pulpar y de las lesiones periapicales⁽¹⁾.

El hidróxido de calcio, es uno de los agentes de mayor uso por sus propiedades bactericidas⁽²⁾. Actualmente se están investigando el uso de nuevas alternativas a los antibióticos convencionales, las que provienen de la naturaleza⁽³⁾.

El propóleo en endodoncia se puede usar debido a sus diferentes propiedades, como bacteriostáticas y bactericidas, así como por la carencia de efectos secundarios que posee, tiene además propiedades antiinflamatorias, antitóxicas, estimulantes y antisépticas⁽³⁾. Es por ello que en la presente investigación se desea comprobar la inhibición bacteriana del propóleo específicamente frente al *Enterococcus faecalis*. El propósito de este estudio fue comparar el efecto antibacteriano entre extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* in vitro.

Por lo dicho anteriormente, se planteó la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro?

Teniendo como objetivo general:

- Evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Y como objetivos específicos:

- Determinar la inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.
- Determinar la inhibición bacteriana del hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.
- Comparar inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en relación al hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Ante lo cual se postuló la siguiente hipótesis:

- El extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% presenta mayor efecto antibacteriano en comparación con el hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

CAPITULO II: MARCO CONCEPTUAL

2.1. Antecedentes de la investigación

Entre los antecedentes que han relacionado la inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio se encontró:

Shrivastava y Kumar⁽⁴⁾ en el 2015, realizaron el estudio “Evaluar y comparar las propiedades antimicrobianas de propóleo y el hidróxido de calcio por sí solo y en combinación con ciprofloxacino y moxifloxacino contra *Enterococcus faecalis*”. La eficacia de estos medicamentos se puso a prueba mediante la comprobación de la zona de inhibición para la cepa específica (ATCC 29212) de *E. faecalis* en diferentes intervalos de tiempo, es decir, 24, 48 y 72 horas. Concluyen que el propóleo y el hidróxido de calcio muestran efecto sinérgico con moxifloxacino y ciprofloxacino contra *E. faecalis*. El propóleo 340 g/mL en combinación con antibióticos y solo es más eficaz que el hidróxido de calcio.

Mayta⁽⁵⁾ en el 2009, realizó un estudio cuya finalidad fue demostrar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo (EEP) de Oxapampa Perú, evaluando in vitro su acción antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* para enfrentarlas a las soluciones: De propóleo al

10% y al 30 % y compararlas con el gluconato de clorhexidina al 0,12 % y al 0,05%. Concluye que el extracto etanólico de propóleo al 30 % tuvo una mayor actividad antimicrobiana in vitro que el extracto etanólico de propóleo al 10 % frente al *S. aureus* (ATCC 25923).

Madhubala⁽⁶⁾ en 2011, realizó un estudio “Evaluación comparativa de propóleo y mezcla triantibiótica como medicamento intracanal contra *Enterococcus faecalis*” El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar la actividad antimicrobiana de hidróxido de calcio, y extracto de etanólico de propóleo como medicamentos intracanal en conductos radiculares infectados por *E. faecalis*. El porcentaje de éxito fue mayor para el propóleo que muestra una reducción antimicrobiana del 100 % en 2 días seguido de hidróxido de calcio, mostrando 82,5 %, 92,2 % y 98,4 % de reducción antimicrobiana en los días 1, 2 y 3 respectivamente. El hidróxido de calcio mostró un aumento gradual de la actividad antibacteriana con un máximo de 100 % en el día 7. Encontraron finalmente que el propóleo fue más eficaz que hidróxido de calcio inhibiendo *E. faecalis* en un plazo de 2 días, y ambos eran igual de eficaces inhibiendo *E. faecalis* a los 7 días.

Awawdeh⁽⁷⁾ en 2009, con la finalidad de investigar la actividad antimicrobiana de medicamento intracanal contra *Enterococcus faecalis* realizó el estudio “Efectividad de propóleo y el hidróxido de calcio como un medicamento intracanal a corto plazo contra *Enterococcus faecalis*: un estudio de laboratorio”. Demostró que el propóleo fue significativamente más eficaz en la inhibición bacteriana que el hidróxido de calcio contra *E. faecalis* después de la aplicación a corto plazo. Finaliza determinando que el propóleo

es muy eficaz como medicamento intracanal para eliminar rápidamente *E. faecalis*.

Herrera D et al.⁽⁸⁾ en 2008, realizaron un estudio con el objetivo de evaluar si existe sinergismo antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, al asociar iodoformo con hidróxido de calcio. El iodoformo mostró mayor inhibición bacteriana frente a *P. aeruginosa* en comparación a la acción inhibitoria mostrada frente a *E. faecalis*. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la acción antibacteriana del hidróxido de calcio puro y asociado al iodoformo, independientemente del vehículo utilizado. Resumieron que el efecto antibacteriano del hidróxido de calcio sobre *E. faecalis* y *P. aeruginosa* prevalece al efecto antibacteriano mostrado por el iodoformo y que la asociación de ambos no altera ese resultado.

Wang L y Sigvas M⁽⁹⁾ en 2007, realizaron un “Estudio comparativo de la efectividad antibacteriana de la asociación de clorhexidina al 2 %, de hidróxido de calcio, puntas de hidróxido de calcio y puntas de clorhexidina frente al *Enterococcus faecalis*.” El objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano sobre el *Enterococcus faecalis*, de una pasta de clorhexidina al 2 % con hidróxido de calcio, puntas de hidróxido de calcio y las puntas de diacetato de clorhexidina, y determinar cuál es ellas es la mejor alternativa de elección en el tratamiento de conductos de piezas dentarias con diagnóstico de necrosis pulpar. Explicaron finalmente que la asociación de clorhexidina al 2% e hidróxido de calcio presenta una mejor acción antibacteriana sobre el *Enterococcus faecalis* que la acción antibacteriana de las puntas de diacetato de clorhexidina y las puntas de hidróxido de calcio.

2.2. Propóleo

El propóleo, es una mezcla compleja de compuestos, es un producto natural resinoso que las abejas recogen de varias plantas y la mezclan con cera de abejas y las enzimas salivales (β -glucosidasa)⁽¹⁰⁻¹⁴⁾.

Las abejas utilizan el propóleo en sus colmenas como protección contra depredadores y microorganismos, para reparar los daños, como un aislante térmico, y para construir los locales asépticos para prevenir la infección microbiana de larvas⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Desde la antigüedad, el propóleo ha sido utilizado por los seres humanos para satisfacer las necesidades de preservación de la salud y los alimentos; pero sólo en los últimos años el interés por este producto natural complejo se ha incrementado debido a su amplio espectro de propiedades biológicas y farmacológicas⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Se afirma que el uso del propóleo remonta a tiempos antiguos, por lo menos a 300 años antes de Cristo donde fue utilizado en la medicina popular y otras actividades en muchas partes del mundo⁽¹⁸⁾.

2.2.1. Composición del propóleo

En cuanto a su composición química, en general se compone 50 %, de resina de cera, 10 % de aceites esenciales, 5 % de polen, y 5 % de otras sustancias que incluyen minerales y compuestos orgánicos como los ácidos fenólicos (cinámico y ácido cafeico, este último podría producir pigmentaciones en los dientes a largo plazo) o su ésteres, flavonoides (flavonas, flavanonas, flavonoles, dihidroflavonoles y chalconas),

terpenos, aldehídos aromáticos y alcoholes, ácidos grasos, estilbenos, y β -esteroides⁽¹³⁻¹⁴⁾.

2.2.2. Actividad del propóleo

En las últimas décadas, varios estudios han demostrado las acciones biológicas y farmacológicas de diferentes muestras de propóleo en todo el mundo⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

La actividad antioxidante se ejerce mediante la inhibición de la actividad de algunas enzimas (por ejemplo, la xantina oxidasa) que inhiben la producción de especies por barrido, interrumpiendo las reacciones que conducen a la peroxidación de los lípidos⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

El propóleo, es importante fuente de fenoles totales, flavonas y flavonoles, y podrían ser beneficiosas para la salud humana debido a sus propiedades antioxidantes⁽¹⁹⁻²⁰⁾.

El mecanismo de la actividad antimicrobiana del propóleo es complejo y puede ser atribuido al sinergismo entre algunos de sus compuestos, tales como flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y otros compuestos fenólicos presentes en su composición⁽²⁰⁾.

Su potencial antiinflamatorio ha sido atribuido a la capacidad de estimular la inmunidad celular ya que promueve la actividad fagocítica e inhibición de la síntesis de prostaglandinas, mediadoras de este proceso⁽²⁰⁾.

2.2.3. Uso en odontología

Rosalen en 1998 en Brasil, observó que la aplicación de extracto de propóleo en molares de ratas redujo la severidad de lesiones cariosas⁽²¹⁾.

Ikeno en 1991 en Japón, demostró que al incluir un extracto etanólico de propóleo, proveniente de China, en agua a una concentración de 1mg/ml, la incidencia de caries disminuyó de 62,2 % a 56,2 %⁽²²⁾. Sforcin en 2007 en Brasil, realizó un estudio para investigar la actividad antibacteriana de propóleo sobre diferentes bacterias orales como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces naeslundii*. En todas las especies estudiadas obtuvo inhibición de crecimiento bacteriano⁽²³⁾.

2.2.4. Procedencia del propóleo

Siendo el Perú un país afortunado por poseer una gran biodiversidad de recursos naturales, gran biodiversidad de flora, fauna, debido a la diversidad de microclimas que en él confluyen y diferentes recursos naturales como el propóleo, es que se presenta como una nueva alternativa para investigar. Diversos estudios en otros países indican que el propóleo presenta una actividad antibacteriana, la cual depende del lugar de origen de extracción. El propóleo presenta características particulares de acuerdo a la ubicación geográfica. Por ejemplo, la actividad antibacteriana de los propóleos europeos se debe a sus contenidos en agliconas flavónicas (galangina y pinocembrina), el propóleo alemán, rico en feniletil-trans-cafeato, bencil ferulato y galangina⁽²⁴⁾. Es por ello que para esta investigación será utilizado el propóleo peruano de la región Cajamarca. Anteriormente no se han realizado estudios con propóleo de esta región, este propóleo resinoso está constituido por una gran variedad de compuestos químicos, que recolectan las abejas, posee propiedades antibacterianas, antimicóticas,

antiparasitarias, antiinflamatorias, antioxidantes, analgésicas, antivirales, estimulantes de la inmunogénesis⁽²⁰⁾.

2.3. Hidróxido de calcio

Es un polvo de color blanco alcalino, muy poco soluble en agua. Se mezcla con un vehículo hidrofílico (agua estéril, solución fisiológica, entre otros), para que se produzca la disociación iónica⁽²⁵⁾.

El uso del hidróxido de calcio Ca(OH)_2 en endodoncia fue introducido por Hermann en 1920. Aunque bien documentado en su tiempo, las aplicaciones clínicas durante los 25 años siguientes no fueron bien conocidas. El hidróxido de calcio no puede catalogarse como un antiséptico convencional, ya que mata las bacterias en el espacio del canal radicular⁽²⁶⁾.

El hidróxido de calcio es ampliamente usado en endodoncia por sus propiedades para controlar la inflamación e inducir la reparación con tejidos duros, así como por su actividad antimicrobiana, lo cual hace aconsejable su empleo como medicación tópica entre sesiones y como componente de materiales de obturación temporarios y definitivos⁽²⁶⁾.

El hidróxido de calcio tiene un alto poder bactericida y es tal vez la medicación más empleada en endodoncia como complemento de la preparación quirúrgica⁽²⁶⁾.

Es un material ampliamente utilizado en odontología conservadora de fácil manejo, sencilla aplicación y de muy bajo costo. El hidróxido de calcio posee un pH muy alcalino (aproximadamente 12.4), lo cual le confiere propiedades letales sobre las bacterias⁽²⁶⁾.

2.3.1. Acción antiséptica del hidróxido de calcio

Se debe fundamentalmente a su alto pH, que hace incompatible el desarrollo microbiano en su contacto⁽²⁷⁾.

El efecto bactericida del hidróxido de calcio se debe a la concentración de iones OH⁻ resultantes de la disolución de producto en iones calcio e hidroxilo, y su efecto a distancia depende de la difusión de dichos iones a través de la dentina⁽²⁷⁾.

2.3.2. Tiempo de aplicación del hidróxido de calcio

Es de suma importancia, ya que los iones OH⁻ se difunden muy lentamente a través de la dentina, debiendo vencer la capacidad buffer de la hidroxiapatita⁽²⁸⁾.

Existen estudios donde la aplicación de hidróxido de calcio por 10 minutos en el conducto radicular no fue efectiva para destruir las bacterias. En cambio, luego de 7 días de aplicación el hidróxido de calcio fue altamente efectivo considerado el tiempo ideal para destruir la flora persistente en el conducto⁽²⁸⁾.

2.3.3. Aplicaciones en odontología

-Acción antiinflamatoria: Debido a su acción higroscópica, a la formación de puentes de calcio proteínas⁽²⁹⁻³⁰⁾.

-Control de la hemorragia: Mediante el taponamiento con el hidróxido de calcio en la superficie hemorrágica, lo cual detiene con efectividad la hemorragia⁽²⁹⁻³⁰⁾.

-Como solución irrigadora (agua de cal): Indicada en biopulpectomías ya que no irrita el muñón pulpar y facilita su reparación⁽²⁹⁻³⁰⁾.

Ha sido utilizado en tratamientos de protecciones pulpares, biopulpectomías parciales, reabsorciones cementodentinarias, reparación de perforaciones al periodonto, como desensibilizante, en soluciones irrigantes y como medicación intraconducto entre sesiones⁽²⁹⁻³⁰⁾.

2.3.4. Formas de presentación

A nivel profesional contamos con varios productos hechos a base de hidróxido de calcio, productos desarrollados y comercializados por Ultradent Products Inc: Dycal® UltraCal XS®. También el hidróxido de calcio en estado puro⁽³¹⁾.

2.3.5. Ultracal XS

UltraCal XS es una formulación exclusiva de hidróxido de calcio en forma de pasta acuosa de pH 12,5. Presentada en jeringa, es una pasta en una solución acuosa para relleno temporal en los conductos radiculares. El hidróxido de calcio tiene un intenso efecto antibacteriano, Ultracal XS viene preparado y listo para su aplicación directa, a nivel radiográfico es radiopaco, otra de sus propiedades es que estimula la formación de dentina secundaria⁽³¹⁾.

2.4. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

Es una bacteria inmóvil, gram-positiva. El tamaño de cada célula oscila entre 0,5 y 0,8 micrómetros. Se puede observar individualmente, en pares o en cadenas cortas, y más a menudo se encuentra en el intestino grueso de los seres humanos. Es un anaerobio facultativo con un metabolismo fermentativo. A menudo puede ser confundido con *S. pneumoniae*, pero *E. faecalis* contiene

muchas características de identificación que pueden verificarse con las pruebas⁽³³⁾.

Enterococcus faecalis tiene implicación en las infecciones del conducto radicular persistentes y es aislado en el 38 % de los casos con microorganismos recuperables⁽³³⁾.

La existencia de *Enterococcus faecalis* se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a prácticamente todos los antibióticos en uso. Son muy resistentes a condiciones adversas (congelación, desecación, tratamiento térmico, etc.) por lo que son buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos congelados⁽³³⁾. Puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal⁽³³⁾.

2.5. Definición de términos básicos

- **Extracto hidroalcohólico de propóleo:** El propóleo es una sustancia resinosa de árboles y arbustos silvestres, que las abejas extraen con el fin de taponar herméticamente su colmena e impedir que se forme dentro de ella cualquier tipo de infección, gracias a la acción antimicrobiana⁽¹⁰⁾.
- Este extracto está hecho a base de alcohol de 70° y 30 gramos de propóleo en su estado natural. Se trata de una combinación exclusiva de todos los componentes del propóleo extraídos con el alcohol⁽³⁴⁾.
- **Inhibición bacteriana:** La inhibición bacteriana es la capacidad para producir el efecto deseado o de ir bien para determinado fármaco capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado. Se considera el diámetro del halo de inhibición

bacteriana el indicador que señala si una bacteria es inhibida en su crecimiento y su medida se da en milímetros⁽³²⁾.

CAPÍTULO III: MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación

3.1.1. Por su finalidad: Básica

3.1.2. Por su grado de profundidad: Explicativa

3.1.3. Por el método de contrastación: Cuasi Experimental.

3.2. Operacionalización de variables:

VARIABLE	INDICADOR	VALORES	ESCALA
Extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% (variable independiente)	Concentración al 30%	Sí No	Nominal
Hidróxido de calcio (variable independiente)	Aplicación del hidróxido de calcio	Sí No	Nominal
Inhibición bacteriana en colonias de <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) (variable dependiente)	Diámetro del halo de inhibición bacteriana	...mm ...mm	Razón

Fuente: Elaboración del investigador.

3.3. Población: Conformado por las colonias de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

3.3.1. Criterios de selección del grupo de estudio

a) Criterios de inclusión:

- Cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) certificada.
- Cultivos incubados por no más de 24 horas.
- Cepas cultivadas en caldo Müeller Hinton según CLSI.

b) Criterios de exclusión:

- Placas de Petri con cultivos contaminados.
- Placas de Petri deterioradas antes o durante la investigación.

3.3.2. Tipos de unidades de la población

3.3.2.1. Unidad de estudio

Placas con agar Müeller Hinton, con colonias de la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

3.3.2.2. Unidad de muestreo

Placas con agar Müeller Hinton con colonias de la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

3.3.2.3. Unidad de observación

Cada una de las placas con agar Müeller Hinton con colonias de la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

3.4. Diseño de contrastación de la hipótesis: Diseño con estímulo creciente – post prueba.

GE: $\xrightarrow{30x}$ A2

3.5. Técnicas de recolección de datos

La observación, usando una hoja de registro como instrumento de recolección de datos.

3.6. Instrumento de recolección de datos

Hoja de Registro donde se anotaron las medidas de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (anexo 1).

3.7. Técnica de análisis de datos

Los resultados fueron sometidos a pruebas estadísticas de Normalidad (Kolmogorov-Smirnovb y Shapiro-Wilk) (anexo 4) y a la prueba U de Mann Whitney (anexo 4), todos los datos procesados de manera automatizada en el programa estadístico SPSS Statistics 24.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

Los resultados se presentaron en tablas simples de contingencia y en un gráfico.

3.8. Consideraciones éticas

La presente investigación se realizó mediante el empleo del propóleo y se obtuvo teniendo en cuenta el cuidado de la biodiversidad. Así mismo se usó la cepa estandarizada de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtenida del laboratorio GenLab, Lima, Perú. No se involucró a humanos o animales, razón por la cual no requirió de consideraciones que protejan sus derechos.

3.9. Recursos

3.9.1. Recursos humanos

a) Equipo de labores

- Investigador: Marcial Enrique González Rojas.
- Asesora: C.D. Esp. Jenifer Chipana Buiza.
- Coasesor: Mg. Q.F. Rafael Tejada Rossi.

b) Equipo auxiliar

- Estadístico: Mg. Julio César Guaylupo Álvarez.
- Personal de laboratorio.
- Personal de apoyo.

3.9.2. Recursos físicos

a) Instrumentos

- Matraz Erlenmeyer 250 mL (Fortuna).
- Matraz Erlenmeyer 100 mL (Fortuna).
- Tubos de ensayo (Fortuna).
- Embudo de vástago corto (Fortuna).
- Micropipeta (10-100 uL) (Accumax Pro®).
- Placas Petri estériles (Fortuna).
- Gradilla.
- Espátula.
- Puntas amarillas.
- Mecheros.
- Pie de rey digital (Digimatic®).

- Programa estadístico SPSS 24.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

b) Equipos

- Estufa (MEMMERT).
- Incubadora (MEMMERT).
- Agitador magnético (IKA[®] C-MAG).
- Balanza de laboratorio (A&D Company[®]).
- Autoclave (H.W. KESELL).

c) Reactivos

- Agar Müeller Hinton.
- Alcohol de 70°.
- Agua destilada.
- Escala de McFarland.
- Cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) certificada.
- Propóleo natural de Cajamarca.
- Hidróxido de calcio (Ultracal XS).

d) Otros

- Tapa de jebe negro estéril.
- Frasco estéril color ámbar.
- Algodón.
- Hisopos estériles.
- Apósitos de gasa y algodón estériles.
- Guantes.
- Copias.
- Plumón indeleble.

- Mascarillas.
- Mandiles.
- Cámara fotográfica.
- Regla milimetrada.
- Encendedor.
- Cofias.
- Lentes de protección.
- Papel Kraft.
- Hilo pabilo.
- Papel aluminio.

3.10. Proceso

Sitio de investigación

Todo el procedimiento experimental de este trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios L101 y L102 de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo (UPAGU), para lo cual se realizó el trámite respectivo y se solicitó el permiso para el uso de dichos laboratorios.

Calibración

- Se capacitó al investigador con el experto en metodología del estudio desde la aplicación de los agentes (extracto hidroalcohólico de propóleo al 30 % e hidróxido de calcio) hasta la observación.

Obtención del propóleo

- El propóleo fue obtenido de forma natural de la apícola “RH & HD” ubicada en Cajamarca a 2750 m.s.n.m. El propóleo fue recolectado de las cantoneras para colmenas (cajas donde se haya preparado y acondicionado adecuadamente para la crianza de abejas); mediante la técnica del “raspado” con una espátula, esta tarea fue realizada con la ayuda de un apicultor especialista en la recolección de este recurso, que tuvo que separar los pedazos de madera, residuos de abejas o plantas del propóleo, el apicultor pesó los 70 gramos adquiridos de propóleo para este estudio (anexo 2, foto 1).

- Para el adecuado mantenimiento se colocó el propóleo en una bolsa y se mantuvo en refrigeración hasta su uso para el extracto que se realizó en el laboratorio L102 de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo (UPAGU) (anexo 2, foto 2).

Esterilización de instrumental

- Todos los materiales de vidrio a usar se esterilizaron a 180 °C por 1 hora en la estufa Memmert[®] siguiendo estándares de calidad y protocolos de bioseguridad (anexo 2, foto 3).

Preparación del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%

Se procedió a preparar el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30 % según Corzo⁽³⁴⁾:

- En la balanza electrónica A&D Company[®] se pesaron 30 gramos de propóleo, requeridos para preparar el extracto hidroalcohólico al 30% (anexo 2, foto 4)⁽³⁴⁾.
- A partir de la masa formada del propóleo se tuvieron que hacer pedazos más pequeños para que puedan entrar en el matraz (anexo 2, foto 5)⁽³⁴⁾.
- A esos 30 gramos en el matraz de Erlenmeyer se les adicionó 100 mL de alcohol de 70 grados, se selló con un jebe negro y se hermetizó con cinta (anexo 2, foto 6)⁽³⁴⁾.
- Se dejó en agitación constante durante 24 horas en el agitador magnético IKA[®] C-MAG, con 1 magneto a una velocidad número 2 y a temperatura ambiente. El matraz con el extracto fue recubierto con papel aluminio para evitar el contacto con la luz y así evitar la desnaturalización del extracto. Se dejó un frasco de 30 mL color ámbar en la estufa Memmert[®] para esterilizarlo y contener el extracto de propóleo (anexo 2, foto 7)⁽³⁴⁾.
- Pasadas las 24 horas se apagó el agitador, se procedió al filtrado con un embudo y una gasa con algodón estéril hacia el frasco color ámbar y se rotuló (anexo 2, foto 8)⁽³⁴⁾.
- El frasco color ámbar fue llevado a refrigeración hasta su utilización (anexo 2, foto 9)⁽³⁴⁾.

Preparación del caldo Mueller Hinton

- Se pesó 1 g de agar Mueller Hinton HIMEDIA® la balanza electrónica A&D Company® y se disolvió en 10 mL de agua destilada en un matraz de 100 mL, se obtuvieron 10 mL de caldo Mueller Hinton (anexo 2, foto 10).
- Posteriormente se vació a 1 tubo de ensayo con tapa rosca, entrando 2 mL de caldo Mueller Hinton, finalmente fue llevado a autoclavar a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos (anexo 2, foto 10).

Reactivación de la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

- Se trabajó con una cepa bacteriana estándar de colonias de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) obtenida del laboratorio GenLab, Lima, Perú (anexo 2, foto 11).
- Se sacó el empaque de la cajita que contiene el microorganismo.
- Se dejó la bolsa que contiene la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) por 20 minutos sin abrir con la finalidad que se adapte a la temperatura ambiente.
- Luego se abrió la bolsa por la muesca.
- Se apretó (una sola vez) la ampolla en la parte superior de la pipeta que contiene el *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) liofilizado (justo por debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- Se sujetó en posición vertical y se golpeó sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido a través del eje hacia la parte superior de la

unidad que contiene el sedimento con *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), luego se dejó que el líquido hidratante fluya a través del eje del hisopo hacia la parte interior de la unidad que contiene el sedimento.

- Se apretó en la parte inferior de la unidad y se trituró el sedimento en el líquido hasta que la suspensión del sedimento se homogenice.

- Se incubó durante 15 minutos a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- La cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) fue sembrada con un hisopo mediante técnica de agotamiento en placa de Petri con agar Müller Hinton e incubada en la incubadora Memmert® a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas (anexo 2, foto 11).

- Pasadas 24 horas, se obtuvo crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y mediante un hisopo se procedió a realizar la recolección hacia el caldo Müller Hinton tomando una pequeña cantidad de colonias bacterianas (3 a 5 colonias de la cepa), al mezclarla en el caldo Müller Hinton presentó una adecuada turbidez que fue comparada con la escala de McFarland 0,5 lo cual significó que la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) había sido estandarizada correctamente (anexo 2, foto 12).

Preparación del agar Müller Hinton

- Se pesaron 28,8 g de agar Müller Hinton HIMEDIA® en la balanza electrónica A&D Company® (anexo 2, foto 14).

- Se colocó el agar Müller Hinton en tres matraces Fortuna® de 250 mL, se mezcló con agua destilada 700 mL. Se tapó previamente con algodón y papel

kraft y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos. Se dejó enfriar hasta 45 °C a 50°C (temperatura en palma de la mano) (anexo 2, foto 15).

3. El medio fue repartido en las 20 placas de Petri para el grupo experimental y 4 placas de Petri para grupo control (25 – 30 mL para placas de 100 mm de diámetro interno), de manera que el grosor del agar en cada placa sea de 4 mm aproximadamente. Finalmente las placas fueron dejadas a enfriar un aproximado de 30 minutos (anexo 2, foto 16).

Control de esterilidad del medio y control de crecimiento bacteriano

En una placa de Petri para grupo control fue servido el medio, agar Müeller Hinton aproximadamente 25 ml, y se esperó a que enfríe. Se dividió la placa en dos mitades, a continuación se realizó la prueba de control de esterilidad llamada así porque en la mitad izquierda no se sembró nada, por lo tanto solo estuvo el medio: agar Müeller Hinton. En la mitad derecha de la placa se realizó la prueba de control de crecimiento, se sembró con un hisopo la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) a partir del caldo Müeller Hinton con la cepa ya reactivada esperando obtener crecimiento en esa mitad. Finalmente la placa de Petri fue colocada en la incubadora a 36°C ± 1°C durante 24 horas (anexo 2, foto 17).

Determinación del efecto inhibitorio

Método de los pocillos

- En la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) que se encontraba en el caldo Müeller Hinton ya reactivada y previamente estandarizada, se procedió

a sumergir en ella un hisopo estéril rotado varias veces y presionado contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido, removiendo de esta manera el exceso de inóculo. Con la ayuda de puntas amarillas estériles se realizaron 2 pocillos de 4 mm cada uno en cada mitad de cada placa de Petri con agar Müller Hinton (anexo 2, foto 18).

- Se inoculó la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en la superficie de las placas de Petri conteniendo pocillos en el agar Müller Hinton mediante la técnica de 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 último paso el hisopo se pasó sobre los bordes del agar. Este procedimiento se realizó por 20 repeticiones (anexo 2, foto 19).

- Se colocaron en un campo el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% y el hidróxido de calcio (Ultracal XS) (anexo 2, foto 20).

- Posteriormente con la micropipeta Accumax Pro® 10-100 uL y con puntas amarillas estériles se colocaron 40 uL del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% y 40 uL de hidróxido de calcio (Ultracal XS) en cada pocillo del agar Müller Hinton con la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), (anexo 2, foto 21).

- Una vez que se colocaron los dos agentes sobre los pocillos, esperamos 15 minutos para luego invertir las placas, y colocarlas en incubación en la incubadora Memmert® a 35°C ± 1°C durante 24 horas (anexo 2, foto 22).

- Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la medición de cada halo de inhibición correspondiente a cada pocillo de los dos agentes utilizados midiendo todo el diámetro con la ayuda del calibrador pie de rey digital. Los datos fueron anotados en una hoja de registro (anexo 1), para luego ser interpretados estadísticamente (anexo 2, fotos 23,24,25).

Diseño cuasi experimental

Grupo problema (20 repeticiones)

En un placa de Petri se encontraba la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en el medio agar Müeller Hinton. Con la ayuda de puntas amarillas estériles se realizaron 2 pocillos en el agar de cada placa de Petri dividida por la mitad, con la micropipeta se adicionaron 40 uL de extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en un pocillo de cada placa. Posteriormente se incubaron las placas de Petri a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido el tiempo requerido, se retiraron las placas de Petri para su observación, lectura y análisis correspondiente.

Grupo control (20 repeticiones)

En un placa de Petri se encontraba la cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en el medio agar Müeller Hinton. Con la ayuda de puntas amarillas estériles se realizaron 2 pocillos en el agar de cada placa de Petri dividida por la mitad, se adicionaron 40 uL de hidróxido de calcio (Ultracal XS) en un pocillo de cada placa. Posteriormente se incubaron las placas de Petri a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido el tiempo requerido, se retiraron las placas de Petri para su observación, lectura y análisis correspondiente.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Con la finalidad de evaluar y comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio frente a cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro, se realizó el test de pocillos en agar, realizando 20 repeticiones, y posterior a la incubación se midió los halos de inhibición en cada uno de ellos.

4.1.1. Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

De la lectura de los halos de inhibición, el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en placas de Petri con agar Müeller Hinton en cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), presentó una media de 10.6 mm, mediana de 10.7 mm, moda de 11.2 mm y un rango de 9.4-11.1 mm. De la lectura de las 20 placas o repeticiones, las medidas de los halos de inhibición, se obtuvo una desviación estándar de 0.6 mm, lo que indica que los resultados no están muy dispersos.

4.1.2. Efecto antibacteriano del hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

El hidróxido de calcio, evidenció la formación de halos de inhibición en placas de Petri con agar Müeller Hinton en cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), con una media de 22.2 mm, mediana de 23.4 mm, moda de 19.2 mm y un rango de 19.2-24.5 mm. De la lectura de las 20 repeticiones de las medidas de los halos de inhibición, se obtuvo una desviación estándar de 2.1 mm lo que indica en ambos casos que los resultados no están muy dispersos.

Tabla 1. Resultados de la medición de halos de inhibición entre el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Repeticiones	Medición de los halos de inhibición	
	Extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%	Hidróxido de calcio (Ultracal XS)
	Halos de inhibición (mm)	Halos de inhibición (mm)
Placa 1	11.2	19.2
Placa 2	10.6	20.4
Placa 3	10.7	23.6
Placa 4	9.4	24.5
Placa 5	11.2	23.4
Placa 6	10.6	20.4
Placa 7	10.7	23.6
Placa 8	9.4	24.5
Placa 9	11.2	23.4
Placa 10	11.2	19.2
Placa 11	9.4	24.5
Placa 12	10.6	23.6
Placa 13	11.2	19.2
Placa 14	10.7	23.4
Placa 15	11.2	20.4
Placa 16	11.2	23.4
Placa 17	10.7	23.6
Placa 18	9.4	24.5
Placa 19	11.2	20.4
Placa 20	10.6	19.2
Promedio	10.6	22.2

Fuente: Datos obtenidos por el investigador.

Tabla 2. Media, mediana, moda, rangos y desviación estándar del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

	Inhibición Bacteriana (mm)				Desviación
	Media	Mediana	Moda	Rango	
Extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%	10.62	10.7	11.2	9.4-11.2	0.68
Hidróxido de calcio	22.22	23.4	19.2	19.2-24.5	2.1

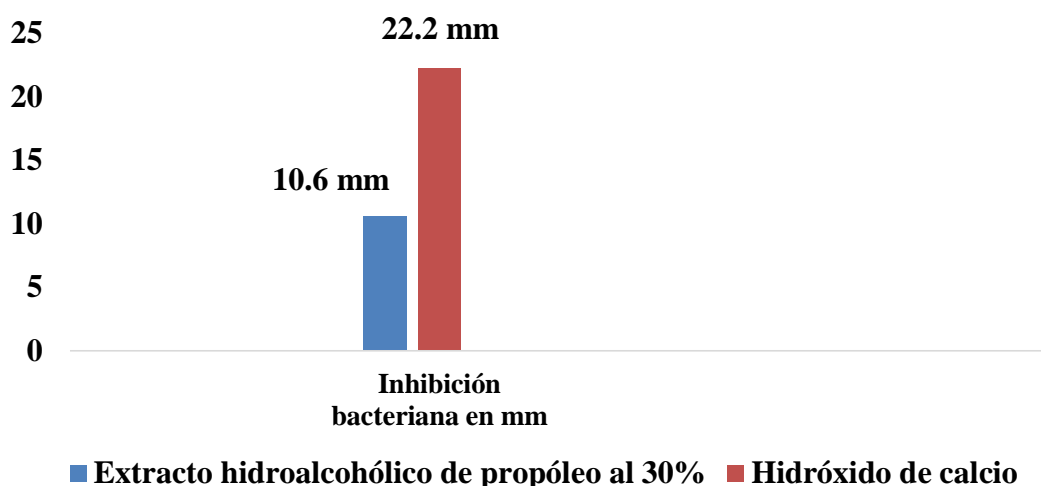
Fuente: Datos obtenidos por el investigador.

4.2. Comparación de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% y del hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Al comparar las medias de los halos de inhibición de los agentes antibacterianos evaluados, el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% presentó un media menor (10.6 mm) en relación al hidróxido de calcio (22.2 mm) en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Mediante la prueba U de Mann Whitney, se obtuvo un valor de $p=0.000$, lo que significa que hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control (hidróxido de calcio) y el grupo problema (extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%).

Gráfico 1, Tabla 3.

Gráfico 1. Inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en colonias de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.



Fuente: Datos obtenidos por el investigador.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%	Hidróxido de calcio	U de Mann-Whitney		
		Promedio	Promedio	Valor
10.6	22.2	0.0	0.0000000498	p<0.05: Hay diferencias significativas ($\mu_1 < \mu_2$)

Fuente: Datos obtenidos por el investigador.

Así mismo, los resultados fueron analizados estadísticamente, mediante pruebas de normalidad (ANEXO 4) y la prueba de U de Mann Whitney, que resolvió que $p < 0.05$: Hay diferencias significativas ($\mu_1 < \mu_2$) al comparar el promedio de la medida de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% con el promedio de la medida de los halos de inhibición del hidróxido de calcio, es decir el hidróxido de calcio es superior al extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Teniendo como objetivo demostrar que el propóleo es un agente con mayor efecto antibacteriano en comparación con el hidróxido de calcio se realizó el presente estudio, evaluando el extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de la región Cajamarca, Perú.

Al evaluar la inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro, esta investigación rechazó la hipótesis planteada, puesto que el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% presentó halos inhibición bacteriana muy reducidos en comparación al hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro, resultado que se contrapone a las investigaciones de Shrivastava y Kumar⁽⁴⁾, Madhubala⁽⁶⁾, Awawdeh⁽⁷⁾, quienes también usaron extracto hidroalcohólico de propóleo frente a cepas estandarizadas de *Enterococcus faecalis*.

Al someter la concentración del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% frente a la cepa de *Enterococcus faecalis*, los resultados obtenidos no fueron los esperados mostrando menor inhibición, con halos de 10.6 mm en promedio (Tabla 1). Refutando a las investigaciones de Shrivastava y Kumar⁽⁴⁾ y Madhubala⁽⁶⁾

En su estudio Shrivastava y Kumar⁽⁴⁾, adicionaron a su extracto hidroalcohólico de propóleo dos medicamentos como ciprofloxacino y moxifloxacino los cuales se compararon al hidróxido de calcio. Encontrando los resultados más altos con halos de 21.94 ± 4.26 mm en promedio para extracto hidroalcohólico de propóleo con moxifloxacino. Seguido de halos de 18.80 ± 1.93 para el extracto hidroalcohólico de propóleo con ciprofloxacino, halos de 14.57 ± 2.17 para hidróxido de calcio con ciprofloxacino, halos de 15.88 ± 2.59 para el hidróxido de calcio con moxifloxacino y halos de 12.89 ± 2.14 para hidróxido de calcio por sí solo. Evaluando las zonas de inhibición en un intervalo de 24, 48 y 72 horas. Probablemente obtuvieron mejores resultados por haber repotenciado el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo con moxifloxacino frente a *Enterococcus faecalis*.

Por otro lado, Madhubala⁽⁶⁾ trabajó con extracto etanólico de propóleo como medicamentos intracanal en los conductos radiculares de dientes incisivos previamente extraídos e infectados con *Enterococcus faecalis*. Dividiendo en 5 grupos de estudio, uno con hidróxido de calcio (grupo 1), mezcla triantibiótica (grupo 2), propóleo (grupo 3), etanol (grupo 4) y solución salina como grupo de control (grupo V). La efectividad antibacteriana de los diferentes medicamentos intracanales se registró al determinar el porcentaje de reducción en los recuentos de colonias (RCC%) al final de los días 1, 2 y 7. Encontrando que el propóleo fue más efectivo que la mezcla triantibiótica contra *E. faecalis* en un período de tiempo de 2 días, y ambos fueron igualmente efectivos a los 7 días. Debiendo probablemente su mayor efecto antibacteriano a que el propóleo es diferente en cada zona de donde proviene⁽²⁴⁾.

Awawdeh⁽⁷⁾ trabajó con un total de 50 discos de dentina de 7 mm de longitud a partir de dientes humanos extraídos. 45 discos se contaminaron con *E. faecalis* y se dividieron en dos grupos de 20 discos. Los discos se trataron de la siguiente manera: 20 discos se llenaron con propóleo, mientras que los otros 20 discos se rellenaron con hidróxido de calcio en presentación de polvo. Los resultados mostraron que el propóleo fue significativamente más eficaz que el hidróxido de calcio en polvo contra *E. faecalis* después de la aplicación a corto plazo. Debiendo probablemente su mayor efecto a que en esta investigación trabajaron con discos de dentina y no con placas de Petri. Probablemente también a que el hidróxido de calcio en polvo tiene menor pH (aproximadamente 12.4) que la presentación usada en esta tesis (Ultracal XS) con un pH de 12.5 y también a la región del propóleo que en este caso fue propóleo de Jordania.

Estos tres autores en sus investigaciones concluyeron que el propóleo posee efecto antibacteriano sobre cepas estandarizadas de *Enterococcus faecalis*, mientras que esta investigación difiere de los resultados encontrados por ambos autores.

Así también otros autores como Mayta⁽⁵⁾, Sforcin⁽²³⁾ realizaron estudios para investigar la actividad antibacteriana de propóleo sobre diferentes bacterias orales como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces naeslundii*. Han demostrado que el extracto hidroalcohólico de propóleo presenta inhibición bacteriana en dichas cepas. Sin embargo, el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% de la provincia y departamento de Cajamarca, presenta menor inhibición bacteriana in vitro sobre cepas de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), según los resultados obtenidos en esta investigación.

En cuanto al hidróxido de calcio, Wang L y Siguas⁽⁹⁾ encontraron que la asociación de clorhexidina al 2% e hidróxido de calcio presentan una mejor acción antibacteriana sobre el *Enterococcus faecalis* que la acción antibacteriana de las puntas de diacetato de clorhexidina y las puntas de hidróxido de calcio. Asemejándose a los resultados obtenidos en esta investigación que muestran que el hidróxido de calcio muestra mejor efecto antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis* debido a su efecto antibacteriano por su pH muy alcalino (aproximadamente 12.4), lo cual le confiere propiedades letales sobre las bacterias⁽²⁶⁾.

Según el método de pocillo usado para determinar la inhibición bacteriana. El resultado nos indica que, el extracto hidroalcohólico propóleo al 30%, no es un buen agente de inhibición bacteriana, ya que un agente es considerado más potente a menor valor de concentración. Esta conclusión probablemente pueda deberse a ciertos factores como el tamaño de los pocillos de esta investigación que fueron de 4 mm, también a que la mayoría de autores no trabajaron bajo nuestra metodología utilizada, algunos autores utilizaron el método de disco difusión en agar.

Debido a la menor inhibición bacteriana el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en los resultados de la investigación surge una polémica fuerte frente a los resultados de otros autores, por lo tanto enfocaremos esta discusión en algunas posibles causas.

Primero, se puede mencionar o atribuir que, el propóleo de una u otra región tiene varianza y no tiene los mismos resultados al ser utilizados como agente para mostrar su efecto antibacteriano, probablemente también dependa del clima en el

que se encuentra, la altura, la biodiversidad, la fauna que está alrededor, características geográficas, las condiciones atmosféricas y a la estación del lugar⁽²⁴⁾.

Como segundo punto, habría que tomar en consideración la calidad, la concentración y el uso de alcohol como solvente del extracto que fue usado para extraer los principios activos del propóleo, ya que la literatura revisada menciona que el alcohol etílico es muy buen solvente para obtener los principios activos de diversas plantas por ello utilizamos alcohol de 70° para garantizar una mayor concentración y extracción de principios activos del propóleo como son: de fenoles totales, flavonas y flavonoles, flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y otros compuestos fenólicos⁽²⁰⁾.

En tercer punto probablemente se podría atribuir el menor efecto inhibitorio a una inadecuada preparación del extracto hidroalcohólico, pero el método usado por el investigador para la elaboración del extracto se basó en el método de: Corzo⁽³⁴⁾ quien elaboró un extracto alcohólico de hojas de *Caesalpinia paraguariensis*.

Es importante resaltar que el proceso para obtener el extracto hidroalcohólico fue supervisado permanentemente por un profesional Químico Farmacéutico, certificado y colegiado.

Como cuarto punto señalaremos a la recolección de la muestra del propóleo, que si no es la más adecuada puede afectar los principios de este. En la presente investigación se realizó bajo la supervisión y ayuda de un apicultor experimentado quien obtuvo el propóleo mediante la técnica del raspado, la cual suele ser la más común y utilizada para obtener este recurso. Asegurándonos que el recurso se encontraba en condiciones óptimas y no afectado por alguna condición adversa

para que nuestro propóleo conserve el máximo de sus principios activos. Es importante mencionar que estos datos no han sido reportados de forma específica en las investigaciones de Shrivastava y Kumar⁽⁴⁾ y Madhubala⁽⁶⁾, quienes investigaron el efecto antibacteriano del propóleo sobre *Enterococcus faecalis*.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

- El hidróxido de calcio presentó mayor efecto antibacteriano en comparación con el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.
- El extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% tuvo menor inhibición bacteriana con un promedio de 10.6 mm en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.
- El hidróxido de calcio tuvo mayor inhibición bacteriana con un promedio de 22.2 mm en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.
- La comparación de los halos de inhibición del hidróxido de calcio y del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro mostró diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$).

6.2. Recomendaciones

- Se recomienda para futuros estudios potenciar al extracto hidroalcohólico de propóleo con otros productos naturales y medicinales como la coca.

- Se recomienda evaluar la acción inhibitoria del extracto hidroalcohólico de propóleo frente a otras bacterias presentes en el complejo dentino pulpar como: *Streptococcus oralis*, *Streptococcus anginosus*, entre otras.
- Se recomienda realizar estudios con el extracto hidroalcohólico de propóleo a otras concentraciones.
- Se recomienda utilizar otra metodología y diferentes métodos como el método de disco difusión para probar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de propóleo.
- Se recomienda hacer más investigaciones con propóleo de otras regiones y de otros sitios de extracción pues es un factor muy importante la zona de obtención del propóleo.
- Se recomienda para futuros estudios encontrar y establecer el pH del propóleo.

REFERENCIAS

1. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 85(1):86-93.
2. Hauman, C., Love, R. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy. Part 1: Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*, 2003, 36: 75-85.
3. Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic S. In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Research.* 2003; 158: 353-357.
4. Shrivastava R, Kumar A. An in vitro Comparison of Endodontic Medicaments Propolis and Calcium Hydroxide alone and in Combination with Ciprofloxacin and Moxifloxacin against *Enterococcus faecalis*. [Internet] 2015,Abr. [Citado el 15 de Abr. de 2016]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26162260>
5. Frank R. Mayta Tovalino, Sonia Sacsquispe Contreras. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923) [Internet] 2009,Abr. [Citado el 13 de Abr. de 2016].

Disponible

desde:<http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/view/1777/173>

6. Madhubala M, Srinivasan N, Ahamed S. Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. [Internet] 2011 Sept. [Citado el 13 de Abr. de 2016]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846550>
7. Awawdeh L, Al-Beitawi M, Mohammad H. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: a laboratory study. [Internet] 2008 May. [Citado el 10 de Abr. de 2016]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703075>
8. Herrera D. Et al Efecto antibacteriano de la asociación de hidróxido de calcio y yodoformo sobre *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*. [Internet] 2008 Jun. [Citado el 20 de Sept. de 2017]. Disponible desde: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/view/1848>
9. Siguas M. Estudio comparativo de la efectividad antibacteriana de la asociación de clorhexidina al 2%, de hidróxido de calcio, puntas de hidróxido de calcio y puntas de clorhexidina frente al *Enterococcus faecalis*. Kiru 2007;4(1):14-16. Disponible desde: <http://www.usmp.edu.pe/odonto/servicio/2007/Kiru2007v4n1/Kiru2007v4n1art3.pdf>

10. Marcucci M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, *Apidologie* 1995 Ene Vol. 26, N° 2, pp. 83–99.
11. Barlak Y. Et al. “Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line,” *Proteome Science* [Internet] 2011 Dic. [Citado el 10 de Abr. de 2016]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3286392>
12. Bankova V. “Chemical diversity of propolis and the problem of standardization,” *Journal of Ethnopharmacology*, [Internet] 2005 Agos. [Citado el 10 de Abr. de 2016]. Vol. 100, N°. 1-2, pp. 114–117. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993016>
13. Bankova, S. L. de Castro, Vassya Bankova, Solange De Castro, Maria Marcucci. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, Springer Verlag, 2000, Vol. 31 N°1, pp.3-15. Disponible desde: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891696/document>
14. Cardoso M., M. Ribeiro, I. L. Ferreira, and A. Cristina Rego, “Northeast Portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons,” *Food and Chemical Toxicology*, [Internet] 2011 Nov. [Citado el 9 de Abr. de 2016].49(11), pp. 2862–2868. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864632>
15. Velikova M. Velikova, Milena; Bankova, Vassya; Sorkun, Kadriye; Popov, Simeon; Kujumgiev, Atanas. “Chemical composition and biological activity of

propolis from Turkish and Bulgarian origin”. [Internet] 2001 Ene. [Citado el 9 de Abr. de 2016] 1(1), pp.57-3. Disponible desde: <https://www.scienceopen.com/document?vid=54445db0-c388-42b8-a1f4-dfff72fbd75e>

16. Fokt H. , H. Fokt, A. Pereira, A. M. Ferreira A. Cunha, and C. Aguiar. “How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis,” in Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and microbial Biotechnology, [Internet] 2010 Ene. [Citado el 9 de Abr. de 2016] 1(2)pp. 481–493. Disponible desde: <http://www.formatex.info/microbiology2/481-493.pdf>
17. Burdock G. “Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis),” Food and Chemical Toxicology, [Internet] 1998 Abr. [Citado el 9 de Abr. de 2016] 36(4), pp. 347–363. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651052>
18. Ghisalberti E.”Propolis a review”. Bee World, 1979 Ene. Vol.60 N°1, pp. 59-84.
19. Claus E. Ralf K, Gehrke C, . “Antiapoptotic Effects Of Propolis Extract And Propel On Human Macrophages Exposed To Minimally Modified Low Density Lipoprotein” [Internet] 2000, Abr. [Citado el 9 de Abr. de 2016]; 50(4): pp.373-379. Disponible desde:https://www.researchgate.net/publication/297542877_Antiapoptotic_effects_of_propolis_extract_and_propel_on_human_macrophages_exposed_to_minimally_modified_low_density_lipoprotein

20. Echevarría J, Pumarola J. El Manual de Odontología. 2a ed. España. 2002. Vol 2 N°1 pp. 40-50.
21. Rosalen P. Efeito da Propólis em rato de Salivado desalivado. 15a reunião anual da sbpqo 1998 May., Vol.1 N°1, pp. 74-30.
22. Ikeno K1, Ikeno T, Miyazawa C. Effects Of Propolis On Dental Caries In Rats. Caries. 1991 Feb; Vol.25 N°5: pp. 347-51.
23. Sforcin J. Propolis And The Immune System: A Review. J Ethnopharmacol. [Internet]. 2007 Aug. [Citado el 9 de Abr. de 2016]; 113(1): pp.1-14. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17580109>
24. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini A. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. [Internet].2002 Sep [Citado el 10 de Abr. de 2016]; 57(5-6): pp. 530-3. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12132697>
25. Soares I, Golberg F. Endodoncia.: Técnicas y fundamentos. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
26. Fernández J , Maresca B. Consideraciones sobre el uso del hidróxido de calcio y el ión calcio en endodoncia. [Internet]. 2008 Jun. [Citado el 9 de Abr. de 2016]; 47(2): pp. Disponible desde: <http://www.ateneo-odontologia.org.ar/articulos/xlvii02/articulo1.pdf>

27. Braga V, Otani A, Moura A. Aplicaciones clínicas del hidróxido de calcio como medicamento intracanal. Rev Fola Oral. 1997 Ene ;Vol.3 N°10: pp 214-9.
28. Ford T. Endodoncia en la práctica clínica. 4ed. México: McGraw-Hill Interamericana; 1999. Vol.1 N°1 pp 15-20.
29. Stock C. Atlas De Endodoncia. Editorial Mosby. 2º Edición. España. 1996. Vol.2 N°3 pp 100-120.
30. Koru O A. Et al. “In vitro Antimicrobial Activity of Propolis Samples from Different Geographical Origins Against Certain oral Pathogens. Anaerobe”. 2007.
31. Ultradent Products, Inc Ultracal XS [Internet]. 2014 Jul. [Citado el 20 de Set. de 2017]; Disponible desde: <https://www.ultradent.com/es/Productos-Dentales/Endodoncia/Preparacion-y-Medicacion/UltraCal-XS-pasta-de-hidroxido-de-calcio/Pages/default.aspx>
32. Herrera M. Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. 2004 Ene. Vol. 39 N°1.
33. Pardi G, Guilarte C, Cardozo E, Briceño E. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracaso en el tratamiento endodóntico. Acta Odontológica Venezolana. 2009; 47: 1.
34. Corzo A, Sgariglia M, Vattuone M, Chifarelli V, Zurita C, Coronel F. Extracto alcohólico de hojas de *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. como

fuelle de principios antimicrobianos contra bacterias patógenas humanas y fitopatógenas. Rev. Quebracho. [Revista en internet]. 2010; 18 (2): 79 - 89. [Citado 12 de agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.fcf.unse.edu.ar/archivos/quebracho/v18a09>

ANEXOS

ANEXO 1: Instrumento de recolección de datos.

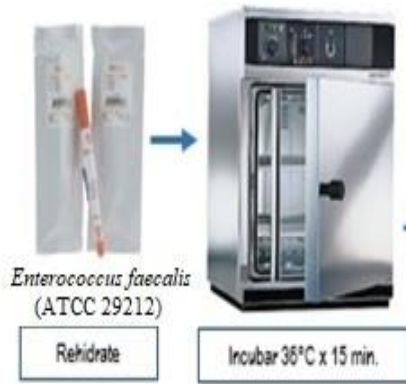
“Inhibición bacteriana entre extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en colonias de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro”

MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN (mm)		
(MÉTODOS DE LOS POCILLOS)		
N° DE PLACAS	PROBLEMA	CONTROL
	Extracto hidroalcohólico de propóleo al 30%	Hidróxido de calcio
Placa 1		
Placa 2		
Placa 3		
Placa 4		
Placa 5		
Placa 6		
Placa 7		
Placa 8		
Placa 9		
Placa 10		
Placa 11		
Placa 12		
Placa 13		
Placa 14		
Placa 15		
Placa 16		
Placa 17		
Placa 18		
Placa 19		
Placa 20		
PROMEDIO		

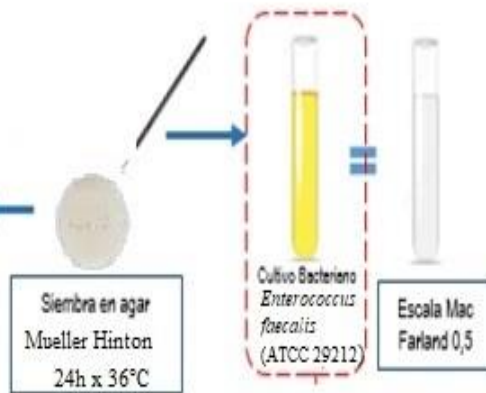
Fuente: Elaboración del investigador.

ANEXO 2: PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO

1 ACTIVACIÓN DE CEPA ATCC



2 ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO:

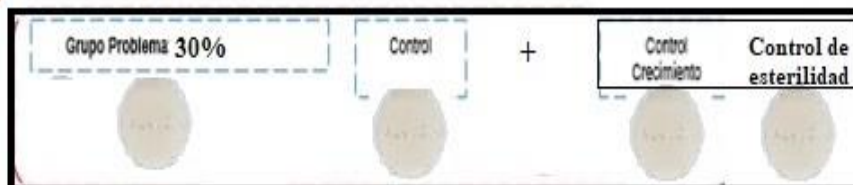


3 IMPREGNACIÓN DE los agentes

Sembrar en placas de agar Mueller Hinton suplementado



4 MÉTODO DE POCILLOS



INCUBAR PLACAS: 35°C x 24 horas -

Realizar 20 repeticiones

LECTURA: Medir halos de inhibición en mm

ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 4. Prueba de U de Mann-Whitney y estadísticos descriptivos de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

Estadísticos de prueba ^a	
	VAR00001
U de Mann-Whitney	0.0
W de Wilcoxon	210.0
Z	-5.45
Sig. asintótica (bilateral)	0.0000000498
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,000 ^b

a. Variable de agrupación: VAR00002

b. No corregido para empates.

Fuente: Datos obtenidos por el investigador.

Tabla 5. Pruebas de normalidad y estadísticos descriptivos de inhibición bacteriana del extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% e hidróxido de calcio en cepa de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) in vitro.

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
VAR00001	0.305	40	0.000	0.790	40	0.000

a. Corrección de significación de Lilliefors

$p < 0.05$: Se debe utilizar una prueba no paramétrica

No cumple la prueba de normalidad según Kolmogorov

Fuente: Datos obtenidos por el investigador.

ANEXO 4: REGISTROS FOTOGRÁFICOS



Foto 1. Apícola “RH&HD” en Cajamarca, y las cantoneras para colmenas, donde se recolecta el propóleo. El apicultor realizando la extracción del propóleo mediante la técnica del raspado.



Foto 2. Los 70 gramos de propóleo en estado puro y en buen estado de conservación, que se usaron en el extracto hidroalcohólico.



Foto 3. Todo el instrumental a usar en la estufa Memmert® a 180° por 1 hora bajo todos los protocolos de calidad para investigación.



Foto 4. 30 gramos de propóleo pesados en la balanza electrónica A&D Company®.



Foto 5. Se hicieron pedazos más pequeños del propóleo para que puedan entrar sin ningún problema al matraz y hacer correctamente el extracto hidroalcohólico.

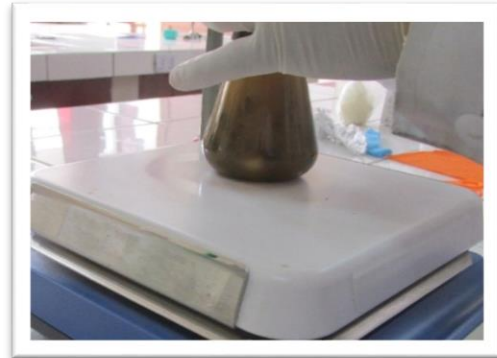


Foto 6. Se adicionaron 100 mL de alcohol de 70° a los 30 gramos de propóleo en el matraz para colocarlo en el agitador magnético IKA® C-MAG.

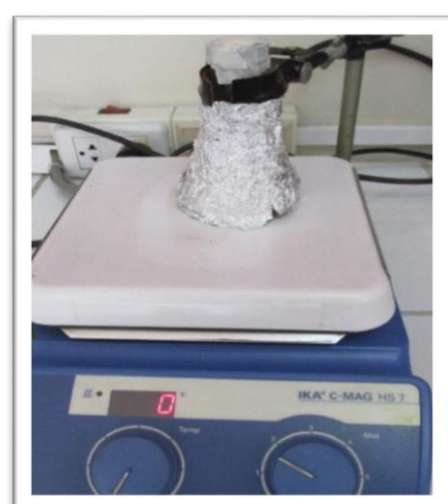


Foto 7. El extracto ya en agitación, fue dejado por 24 horas y se le colocó papel metálico para protegerlo de la luz y evitar la desnaturalización del mismo.



Foto 8. Pasadas 24 horas se procedió a realizar el filtrado, con el embudo y gasas estériles, hacia el frasco color ámbar anteriormente esterilizado.



Foto 9. El extracto hidroalcohólico rotulado en el frasco y en estado de conservación hasta su posterior uso.



Foto 10. Preparación del caldo Müller Hinton. Obteniendo 2 mL de caldo.



Foto 11. Cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) certificada.

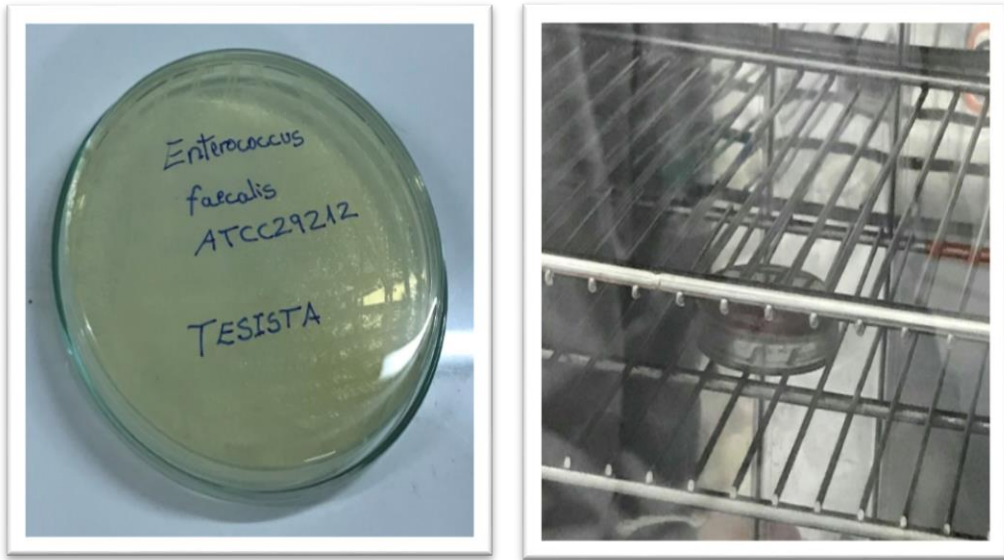


Foto 12. Siembra de la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) posteriormente fue colocado en la incubadora Memmert® a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas.



Foto 13. La cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) luego de haber estado en la incubadora, comparada con la escala de McFarland 0,5 que aseguró la reactivación de la cepa.

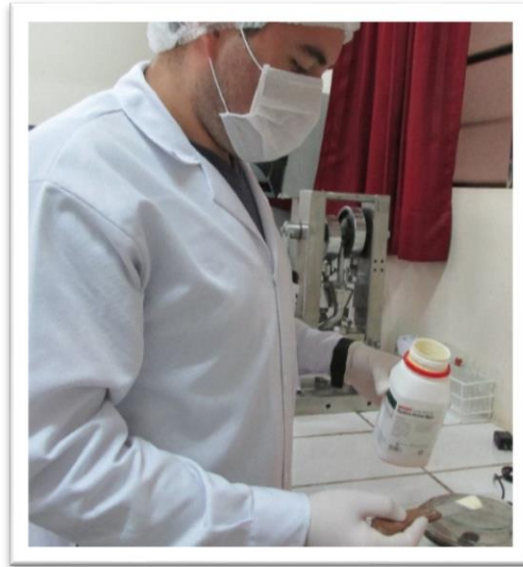


Foto 14. Se pesó el agar Müller Hinton en la balanza electrónica A&D Company®.



Foto 15. Los tres matraces Fortuna® de 250 mL con el agar Müller Hinton, los matraces puestos en autoclave a 121 °C, 15 lb por 15 minutos.

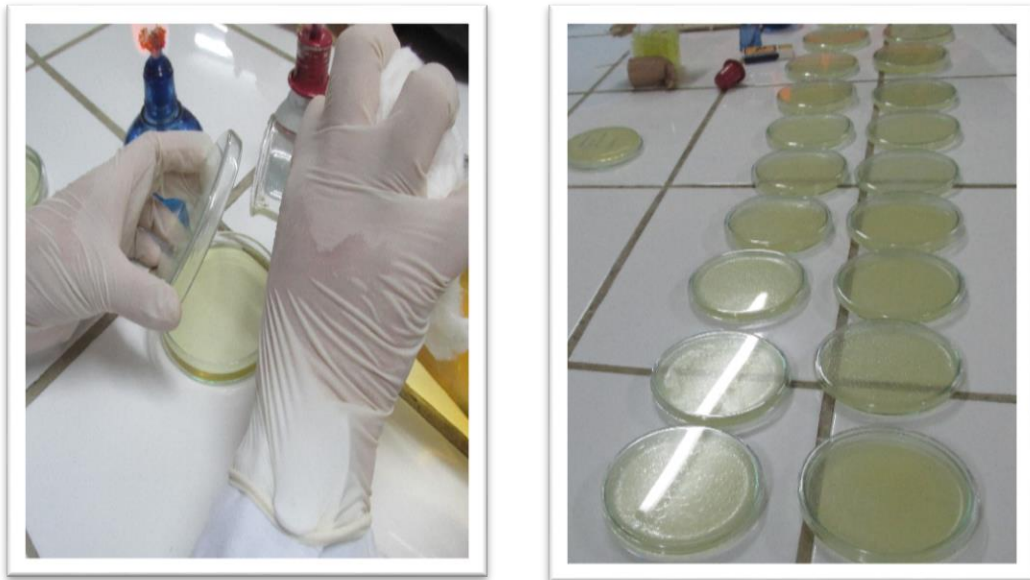


Foto 16. El medio fue repartido en placas de Petri estériles.

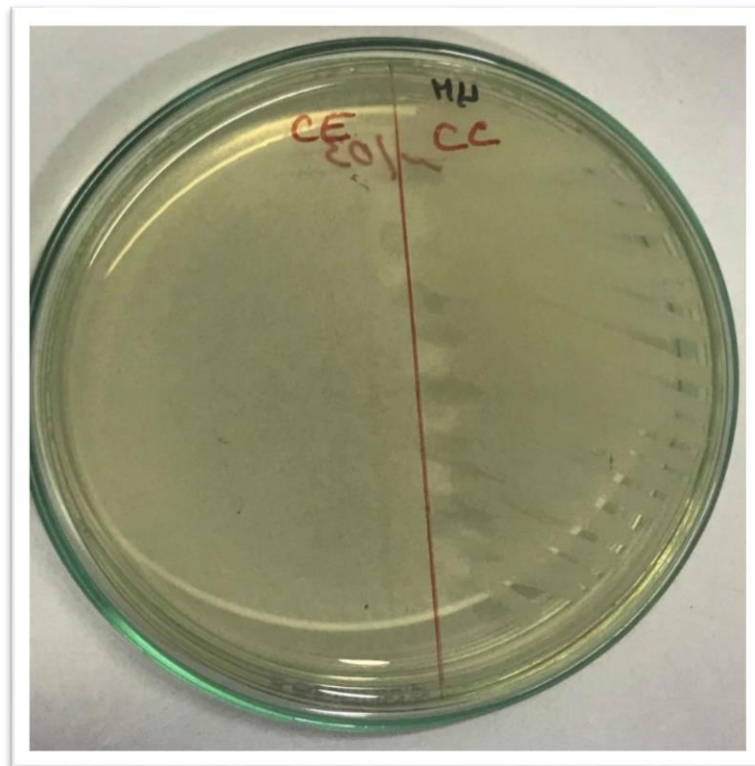


Foto 17. Control de esterilidad y control de crecimiento bacteriano de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

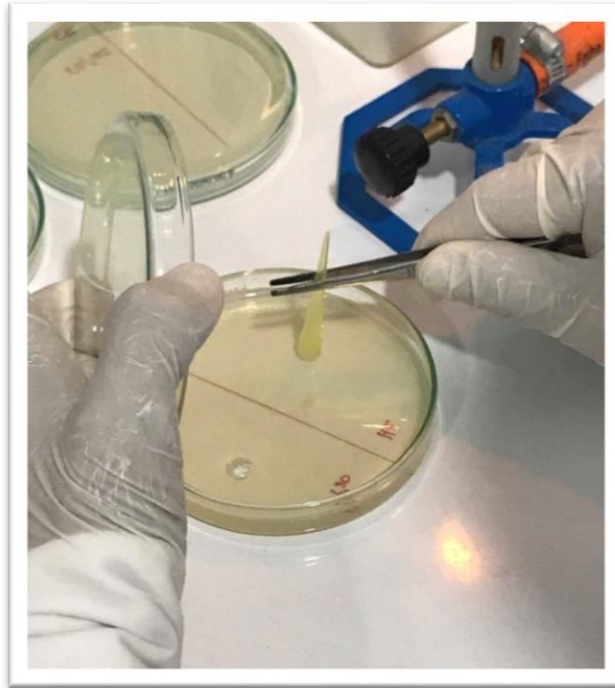


Foto 18. Realización de pocillos con puntas amarillas, 1 pocillo en cada mitad de la placa de Petri.



Foto 19. Inoculación de la cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) en el agar Müeller Hinton con los pocillos mediante la técnica de rayado.



Foto 20. Extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% y el hidróxido de calcio (Ultracal XS) en el campo de trabajo para ser usados.

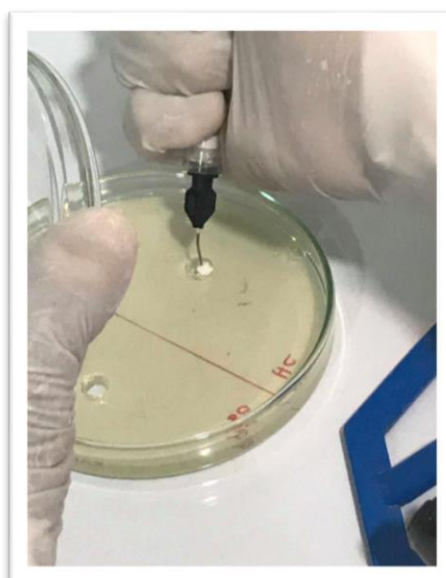


Foto 21. Colocación de extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% con la micropipeta Accumax Pro® e hidróxido de calcio (Ultracal XS) en los pocillos.

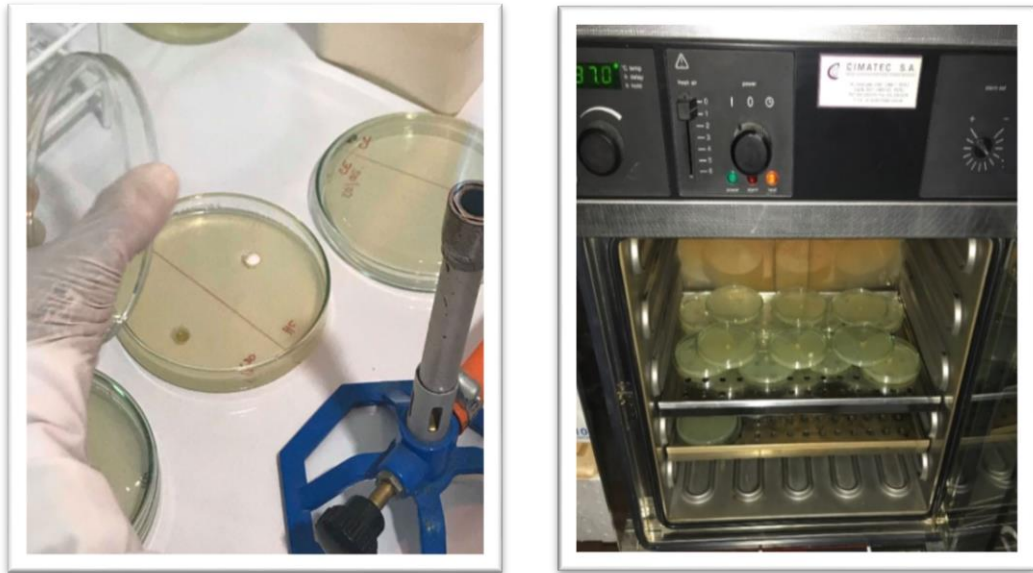


Foto 22. Placas con los agentes en los pocillos y finalmente fueron puestas en la incubadora Memmert® a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

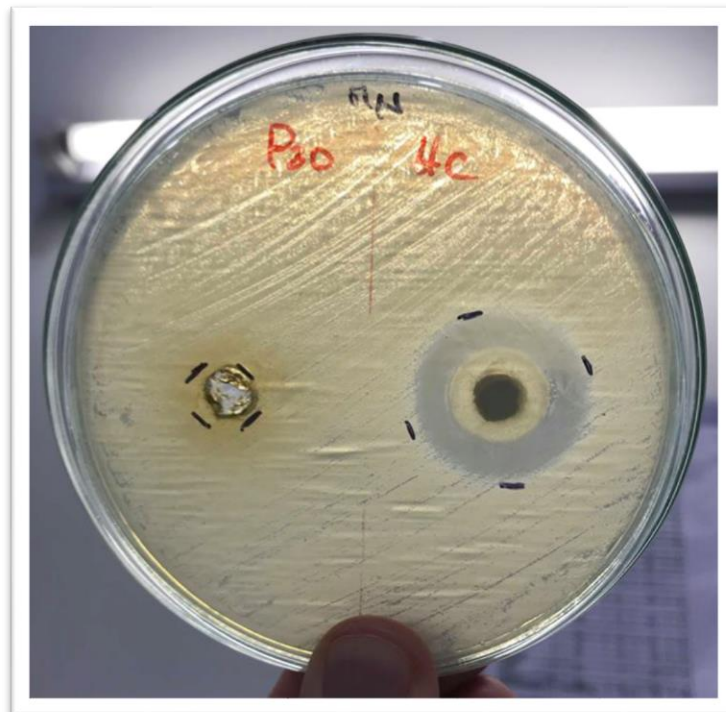


Foto 23. Placa de Petri con el halo de inhibición producido por el extracto hidroalcohólico de propóleo al 30% (izquierda).

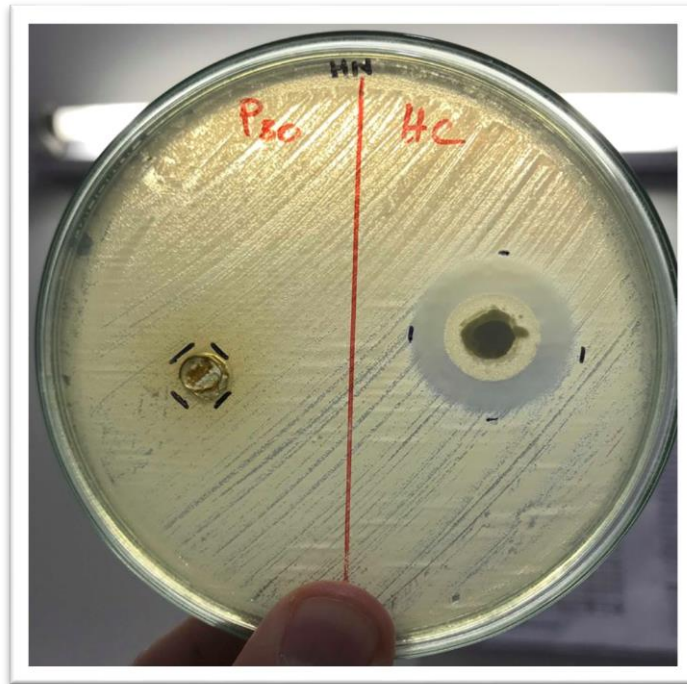


Foto 24. Placas de Petri con el halo de inhibición producido por el hidróxido de calcio (Ultracal XS) (derecha).

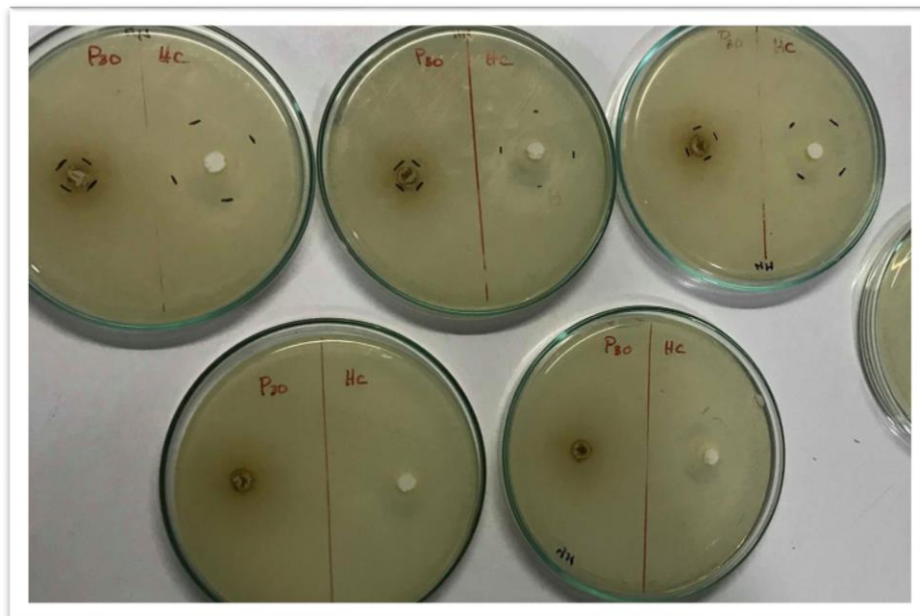


Foto 25. Halos de inhibición formados en algunas de las placas de Petri.