



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

Facultad de Odontología

EFICACIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
PROPÓLEO FRENTE A LA *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Tesis para optar el título de Cirujano Dentista

AUTOR

Gonzales Carrillo, Gean Carlos

ASESOR

Esp. Velásquez Morales, Ricardo

JURADO

Dr. Sotomayor Mancicidor, Oscar Vicente

Mg. Mendoza García, Eloy Javier

Dr. Munayco Magallanes, Américo Alejandro

C.D. Pardo Matos, Orison Armando

Lima - Perú

2018

DEDICATORIA

A Dios, por permitirme lograr cada objetivo propuesto guiando siempre mis pasos.

A mis padres por apoyo brindado en cada momento de mi vida.

A cada de mis familiares que siempre estuvieron a mi lado en cada instante de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Federico Villarreal por la formación brindada en los años estudio transcurridos.

Al Dr. Ricardo Velásquez Morales por el asesoramiento continuo durante el proyecto y el desarrollo de mi tesis.

Al Dr. Adrián Mallma Medina por el tiempo brindado para la finalización del proyecto.

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano a concentraciones del 5, 10 y 20% frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 24 y 48 horas. Metodología: Se realizó el método de difusión del agar. Los halos de inhibición se midieron usando un calibrador vernier y fueron registrados en una ficha de recolección de datos. Los datos fueron analizados con la prueba de contrastes múltiples de Tanhame para grupos independientes mientras que para la comparación entre tiempos se utilizó la prueba t de student para muestras relacionadas. Resultados: Se ha observado en todos los grupos entre las 24 y 48 horas demostrando ser altamente estadísticamente significativa ($p < 0.005$) ya que la distribución de los valores del diámetro del halo inhibitorio muestra un aumento diferente tanto entre grupos como dentro de cada uno de ellos. En conclusión, el extracto etanólico de propóleo al 20% medido a las 48 horas presenta una eficacia antibacteriana frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* semejante a la eficacia antibacteriana de la clorhexidina (0.12%). Conclusiones: Se ha concluido que existe eficacia del propóleo y podría usarse a futuro como medicina natural para el tratamiento de la enfermedad periodontal, para ello se necesita realizar investigaciones utilizándolo para poder confirmar esta posibilidad.

Palabras clave: Propóleo, *Porphyromonas gingivalis*, clorhexidina

Abstract

The objective of the present investigation was to evaluate the antibacterial efficacy in vitro of the ethanolic extract of Peruvian propolis at concentrations of 5, 10 and 20% against strains of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 at 24 and 48 hours. The antibacterial efficacy was determined using the agar diffusion method. The inhibition halos were measured using a vernier calibrator and recorded in a data collection form. The data were analyzed with the Tanhame multiple contrast test for independent groups, while the student t test for related samples was used for comparison between times. The results showed the increase observed in all the groups between 24 and 48 hours, showing to be highly statistically significant ($p < 0.005$) since the distribution of the values of the diameter of the inhibitory halo shows a different increase both between groups and within each one. from them. In conclusion, the ethanol extract of propolis at 20% measured at 48 hours presents an antibacterial efficacy against strains of *Porphyromonas gingivalis* similar to the antibacterial efficacy of chlorhexidine (0.12%). Propolis may be used in the future as a natural medicine for the treatment of periodontal disease, for which it is necessary to carry out research using it in order to confirm this possibility.

Keywords: Própolis, *Porphyromonas gingivalis*, chlorhexidine

INDICE

I.	Introducción.....	8
II.	Marco teórico	
	2.1 Bases teóricas.....	10
	2.2 Antecedentes.....	17
	2.3 Justificación.....	21
	2.4 Hipótesis.....	21
III.	Objetivos	
	3.1 Objetivo general.....	22
	3.2 Objetivo específico.....	22
IV.	Materiales y métodos	
	4.1 Tipo de estudio.....	23
	4.2 Población/Muestra y Criterios de selección.....	23
	4.3 Variables/Definición/Operacionalización.....	24
	4.4 Método/Técnica/Procedimiento.....	26
	4.5 Consideraciones éticas.....	28
	4.6 Plan de análisis.....	28
V.	Resultados.....	30
VI.	Discusión.....	40
VII.	Conclusiones.....	43
VIII.	Recomendaciones.....	44
IX.	Referencias bibliográficas.....	45
X.	Anexos	
	Anexo n° 1 Ficha de datos.....	50
	Anexo n° 2 Matriz de consistencia.....	51

Anexo n° 3 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.....	52
Anexo n° 4 Prueba de homogeneidad de Levene.....	53
Anexo n° 5 Fotos.....	54

I. Introducción

El propóleo o propolis es un compuesto complejo resinoso que se obtiene a partir del exudado vegetal mezclado con saliva de la abeja que es utilizada en la protección de la colmena. Entre las propiedades farmacológicas más conocidas del propóleo están las antibacterianas, antiinflamatorias, fungicidas, antivirales, antiulcerosas y analgésicas (López y Ubillus, 2004, p.09).

El uso medicinal de las plantas se le conoce como fitoterapia que desarrolla métodos antibacterianos y antiinflamatorios de manera natural y es materia de estudio. Además, impulsa la investigación en los diferentes campos de la medicina. En odontología se está investigando para encontrar y aplicar métodos que ayuden a combatir los diferentes problemas de salud pública.

Debido a las reacciones adversas de los colutorios y antimicrobianos, reportados en la literatura científica en el tratamiento de la periodontitis, es que se ha demostrado un gran interés por buscar alternativas como medicamentos naturales que posean una eficacia antibacteriana similar o mejor a los fármacos ya conocidos, creando un tratamiento alternativo a diferentes problemas, que se pueden encontrar en la cavidad bucal (Infantes y Millones, 2015, p.568).

“La enfermedad periodontal es una patología de etiología bacteriana muy frecuente en la cavidad bucal la cual destruye los tejidos de soporte del diente causando en muchos casos la pérdida de piezas dentarias” (Lindhe, Lang & Karring, 2011, p.53).

“La enfermedad periodontal en su estadio más avanzado se denomina periodontitis que es causada por diferentes microorganismos situados en la placa subgingival, donde uno de los microorganismos anaerobios gramnegativos predominantes es la *Porphyromonas gingivalis*” (Eley, Soory & Manson, 2012, p.57).

Este microorganismo es un bacilo anaerobio estricto gram negativo que actúa de manera permanente en la periodontitis causando bolsas periodontales y destruyendo el tejido conectivo causando reabsorción ósea, además de ser predominante en la infección periodontal también está presente en enfermedades sistémicas como la aterosclerosis, alteraciones respiratorias, artritis reumatoide y alteraciones en el embarazo (Marsh & Martin, 2011, p.37).

“En el tratamiento químico de la periodontitis se utilizan colutorios y antimicrobianos orales los cuales tienen como finalidad detener la extensión de la infección que puede causar una futura pérdida de piezas dentarias, así como también los riesgos sistémicos” (Naverac, de Grado & Gil, 2007, p.41).

Debido a las propiedades antibacterianas del propóleo es que se propone como una alternativa de tratamiento natural frente a los fármacos convencionales en la *Porphyromonas gingivalis* que es un microorganismo predominante en las enfermedades periodontales específicamente en la periodontitis.

¿Cuál es la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de propóleo frente a la *Porphyromonas gingivalis* in vitro?

II. Marco teórico

2.1. Bases teóricas

El propóleo es una sustancia resinosa recogida por *Apis mellifera* de varios capullos que luego usan para cubrir piezas de la colmena y para sellar grietas en la colmena. El propóleo ha sido utilizado por el hombre desde los primeros tiempos para varios propósitos como antiséptico, antioxidante, antiinflamatorio, y un adhesivo para sellar grietas; para proteger madera y otras superficies. La palabra "propóleo" se deriva del griego pro (para "enfrente a" o "a la entrada de") y polis ("comunidad" o "ciudad") y significa una sustancia en defensa de la colmena. (Toreti, Sato, Pastore & Park, 2013, p.1).

La *Apis mellifera* o abeja es conocido por elaborar el propóleo de acuerdo a las necesidades que requiere además es muy importante las fuentes de materia prima, por lo que se ha demostrado que es casi imposible encontrar dos colmenas que produzcan propóleos similares o idénticos, aun así, esté ubicado cerca o en la misma zona geográfica. Los propóleos de las diferentes partes y estructuras de la colmena no tendrán similitud de composición. En la composición del propóleo se encuentran diferentes compuestos como lo son resinas y bálsamos aromáticos en un 50 a 55 %, cera en un 7,5 a 35%, aceites volátiles en 10%, polen de 4 a 5% y sustancias orgánicas y minerales en 5% (López y Ubillus, 2004, p.10).

El propóleo o propolis es un producto natural producido por las abejas con un amplio espectro de propiedades biológicas. Es preparado por las abejas para mantener la humedad y temperatura estable en la colmena durante todo el año. Como los principales componentes del propóleo están los flavonoides que contribuyen en gran medida a las actividades farmacológicas propias, es ampliamente utilizado para prevenir y tratar resfriados, heridas, úlceras, reumatismo, esguinces, enfermedad del corazón, diabetes y caries dental debido a sus diversas propiedades biológicas tales como antiinflamatorio, antimicrobiano, antioxidante,

antitumoral, antiulceroso y actividades anti-VIH. La amplia aplicación del propóleo en la medicina moderna ha atraído una atención creciente hacia su composición química (Huang, Zhang, Wang, Li & Hu, 2014, p.19610).

Dependiendo de la procedencia botánica, la *Apis mellifera* extrae con el fin de taponar totalmente la colmena, así como no permitir que se forme dentro de la colmena cualquier forma de infección. El propóleo posee un sabor acre, casi siempre amargo y un aroma agradable y dulce, de forma que, cuando se procede el proceso de quemado, expulsa un aroma de resinas agradables al olfato. Las *Apis mellifera* o abejas utilizan el propóleo con múltiples fines como lo son: Tapizar el interior de las celdas y las cámaras de cría y tamponar las evitando la contaminación reforzando los tabiques y las paredes de todo lo que pueda ser inestable, sellando las pequeñas grietas que existen en la colmena disminuyendo así la formación de elevadas corrientes de aire, otra de las múltiples ventajas es disminuir a lo más mínimo los agujeros de entrada a la colmena evitando que puedan ingresar extraños depredadores que puedan atacar a la colmena, evitar los movimientos y vibraciones de las colmenas que se encuentran en localidades que están expuestas a fuertes corrientes de viento, amortigua los sonidos elevados o dañinos a los cuales las abejas son inmensamente vulnerables, mantiene estabilidad de la temperatura en el interior de la colmena (aproximadamente de 30° C), mantiene estabilidad del nivel de humedad en el interior de la colmena imposibilitando el ingreso de agua, evita la evaporación intensa, debido a que las larvas urgen para su desarrollo un determinado punto de humedad para momificar y aislar los cadáveres de los depredadores o criaturas extrañas que hayan ingresado al interior de la colmena ya que estos por sus dimensiones se les hace casi imposible de eliminarlos del interior de la colmena (López y Ubillus, 2004, p.09).

Es importante tener en cuenta que la mayoría de las últimas investigaciones sobre los nuevos constituyentes, conectado a su actividad biológica, se ha descubierto que el propóleos

tiene un amplio espectro biológico y propiedades farmacéuticas y que tiene efectos antimicrobianos directos *in vitro*. Algunos estudios sugieren que el propóleo se puede utilizar en medicina y odontología (Toreti *et al.*, 2013, p.8).

Es relevante e importante las diferentes propiedades terapéuticas de este elemento natural llamado propóleo, el cual, sus múltiples y diferentes propiedades han sido verificadas por reconocidas revistas y artículos científicos en diferentes países del mundo, concordando en el mismo sentido casi siempre en las referencias que se obtuvieron, independientemente de la procedencia geográfica del producto. Únicamente el factor enlazado al análisis de su composición química son los que permiten las diferentes combinaciones, justificando la variabilidad de las patologías en la que los fármacos compuestos a base de propóleo han sido empleados. Las atribuciones terapéuticas del propóleo mundialmente conocidas son las sucesivas: antibacteriales, antimicóticas, antiparasitarias, antioxidantes, antitóxicas, antialérgicas, analgésicas, anticolesterolémica, anestésicas, antiinflamatorias, antivirales, citostáticas, antituberculosas, desodorantes, epitelizantes, fitoinhibidoras, hipotensoras, antipiréticas y las estimulantes de la inmunogénesis (López y Ubillus, 2004, p.11).

La principal causa de la enfermedad periodontal es la infección bacteriana. Sin embargo, en pequeñas cantidades de placa son compatibles con la salud gingival y periodontal y algunos pacientes pueden convivir con grandes cantidades de placa durante largos periodos sin desarrollar periodontitis, aunque presenten gingivitis. Actualmente se está generalizando mencionar distintas patologías periodontales con posible etiología diferente. Sin embargo, se han tomado solo tres tipos de enfermedades periodontales inflamatorias como características. La patología periodontal crónica incluye enfermedades que van desde la gingivitis hasta la periodontitis avanzada, con diferentes velocidades de progresión y también diferentes formas clínicas (Eley *et al.*, 2012, p.36).

La flora bacteriana oral es la causa etiológica principal de la enfermedad periodontal en donde parece existir un límite muy delicado entre el equilibrio de salud y enfermedad que depende específicamente de la naturaleza de la flora bacteriana y del huésped frente a esas bacterias que pueden ser predominantemente protectora o patógena (Eley *et al.*, 2012, p.57).

Es muy importante clasificar las diferentes enfermedades para así separar las diferentes situaciones en distintas categorías con el fin de posibilitar el diagnóstico clínico y de laboratorio y proponer el tratamiento más eficaz. Lo ideal es que los diferentes criterios para la clasificación de las enfermedades sean etiológicos, genéticos e histopatológicos, en lugar de la edad de inicio y el ritmo de progresión de la enfermedad. Durante los últimos años ha habido tres intentos importantes por clasificar la enfermedad periodontal (Eley *et al.*, 2012, p.139).

Un taller realizado en el año 1999 en donde el objetivo fundamental fue realizar una clasificación de las diferentes enfermedades periodontales que se conocían en ese entonces, el taller fue conocido mundialmente como Workshop on the Classification of Periodontal Diseases, 1999. La nueva clasificación resultante comprende ocho categorías principales: Enfermedades gingivales, Periodontitis crónica, Periodontitis agresiva, Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas, Enfermedades periodontales necrosantes, abscesos del periodonto, Periodontitis asociada con lesiones endodónticas y Deformidades y afecciones de desarrollo o adquiridas (Lindhe *et al.*, 2011, p.55).

Por diversas razones desde 1999 no se había realizado otra clasificación de las enfermedades periodontales, y con las actuales evidencias y mayor comprensión científica sabemos que los fenotipos de las enfermedades tienen variedades, etapas o fases y grados de progresión y severidad. La alta prevalencia mundial de la periodontitis la convierte en tema de interés de salud pública para todas las profesiones del área médica. Muy recientemente en

la ciudad de Ámsterdam durante la novena edición del EUROPERIO recibimos la nueva clasificación de enfermedades y condiciones periodontales y periimplantarias. Justo al cierre de esta edición, el 21 de junio de 2018 la Academia Americana de Periodontología (AAP) y la Federación Europea de Periodontología (EFP) publicaron conjuntamente en sus respectivos medios esta exhaustiva actualización proveniente del Taller Mundial de 2017 realizado en Chicago, ILL. Este taller estuvo conformado por cuatro grupos de expertos que contemplaron en el grupo 1; salud periodontal, enfermedades y condiciones gingivales, grupo 2; periodontitis, grupo 3; desarrollo y condiciones adquiridas en manifestaciones periodontales de enfermedades sistémicas, y grupo 4; enfermedades y condiciones periimplantarias (Zerón, 2018, p.122).

Los signos clínicos característicos de la periodontitis comprenden: pérdida de inserción clínica, pérdida de hueso alveolar, formación de bolsas periodontales e inflamación gingival. A esto se puede asociar una recesión gingival, sangrado al sondaje, movilidad dentaria aumentada, supuración y a la pérdida dentaria. En los casos de periodontitis crónica la infección progresa de forma continua o en picos de actividad: Según su extensión se clasifican en Localizada y Generalizada, y según la severidad: Periodontitis leve, Periodontitis moderada y periodontitis severa (Bascones y Figuero, 2005, p.153).

La periodontitis es una infección con presentaciones clínicas polimorfas. Esto ha llevado al reconocimiento de diferentes síndromes clínicos. Hasta hace poco tiempo, la cuestión acerca de si estas presentaciones clínicas disímiles representaban o no distintas formas de enfermedad había quedado abierta a la discusión. La periodontitis agresiva (PA) comprende un grupo de formas raras y a menudo severas de periodontitis rápidamente progresiva, caracterizada por un comienzo y una tendencia distintiva a la agregación familiar. Las características secundarias que se consideran generalmente son: Proporción elevada de

Actinobacillus actinomycetemcomitans, y en algunas poblaciones de extremo oriente, de *Porphyromonas gingivalis* (Lindhe *et al.*, 2011, p.228).

“*Porphyromonas gingivalis* es una especie de bacilo gram negativo pequeño (cocobacilo), no móvil, anaerobio estricto, asacarolítico, que forma colonias uniformes de coloración verdosa, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular” (Holt, Kesaval, Walker & Attardo, 1999, p.170).

La *Porphyromonas gingivalis* es un bacilo corto o cocobacilo, que mide de 0.5 - 0.8 μm x 1 - 3.5 μm anaerobio estricto, gram negativo, siendo considerado un comensal en la cavidad oral. La 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. Produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos (Ramos, Moromi y Martínez, 2011, p.34).

La *Porphyromonas gingivalis* se aísla principalmente de sitios subgingivales, especialmente en lesiones periodontales avanzadas, aunque también han sido recolectadas de la lengua y las amígdalas. Se han reconocido seis serotipos basados en los polisacáridos capsulares (antígenos K). La *P. gingivalis* es altamente virulenta en estudios experimentales de la infección en animales, y producen una gama de supuestos factores de virulencia asociados a la destrucción de tejido y a la alteración de las defensas de anfitrión (Marsh & Martín, 2011, p.38).

Se ha comprobado que los lipopolisacáridos (LPS) estimulan a la producción de IL-6 e IL-8 desde los fibroblastos procedentes del ligamento periodontal humano. Los diferentes estudios nos indican que los lipopolisacáridos de la *Porphyromonas gingivalis*, en especial el lípido A, es suficiente para estimular el proceso inflamatorio del hospedero a través de la elevada producción de citocinas. Las cepas de *Porphyromonas gingivalis* producen una gran

cantidad de proteinasas y enzimas, así como también productos finales propio de su metabolismo que además son activos contra el amplio espectro de proteínas del hospedero. Los compuestos mencionados nos señalan a los inhibidores de inmunoglobulinas, proteinasas que contienen hierro, proteínas de matriz extracelular, proteínas bactericidas y proteínas íntimamente envueltas en las mencionadas funciones, tales como fijación de coagulación y complemento (Holt *et al.*, 1999, p.175).

Años atrás existía un uso adecuado de diferentes antibióticos para el tratamiento de las diferentes enfermedades periodontales. Sin embargo, en los últimos años se ha producido un inmenso interés por el uso de antibióticos para el tratamiento de las patologías orales y se han publicado numerosos artículos científicos y revistas para tratamiento de dichas enfermedades. Los antibióticos más usados en el tratamiento de los pacientes que padecen de enfermedad periodontal son: tetraciclinas, penicilinas, eritromicina, clindamicina, metronidazol, vancomicina y gentamicina. Las reacciones adversas que trae el uso de antibióticos son: efectos tóxicos, trastornos gastrointestinales, hipersensibilidad y casi siempre las bacterias desarrollan resistencia bacteriana a los antimicrobianos (Eley *et al.*, 2012, p.242).

En los últimos años, se han establecido protocolos en el tratamiento de las enfermedades periodontales en la cavidad bucal, indicando un tratamiento farmacológico sistémico basado en antimicrobianos; pero su uso es cuestionado porque produce resistencia bacteriana a causa del uso innecesario e indebido de estos. Actualmente, existen numerosos estudios que plantean nuevas alternativas de medicación, empleando productos alternativos que derivan de plantas nativas de la región. Por ejemplo, el propóleo es uno de estos productos naturales derivado de “plantas medicinales”, al que numerosos estudios atribuyen beneficios y propiedades terapéuticas (Infantes y Millones, 2015, p.568).

2.2. Antecedentes

Agarwal, Vemanaradhy & Mahta (2012) determinaron la composición química en términos de compuestos fenólicos totales y flavonoides presentes en el propóleo chino y evaluaron in vitro la actividad antimicrobiana y la concentración inhibitorias mínimas para Pg y Aa. En un estudio experimental utilizando cepas bacterianas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). Se usó el método de difusión de pozos de agar para evaluar el potencial antimicrobiano del propóleo contra Pg y Aa. La concentración mínima inhibitoria del propóleo contra las dos bacterias se determinó usando la técnica de dilución en serie del tubo el resultado de la zona inhibidora que representa la actividad antimicrobiana se extendió de 18 a 25 mm para Pg y de 12 a 14 mm para Aa. El rango de concentración del propóleo chino que es sensible para inhibir el crecimiento de Pg fue 0.1-0.0125 µg / ml y para Aa fue de 0.1-0.025 µg / ml. El propóleo chino tiene potente actividad antimicrobiana contra los dos periodontopatógenos, lo que sugiere su posible uso como una alternativa natural a los antibióticos sintéticos ampliamente utilizados en la terapia periodontal.

Akca *et al.* (2016) el objetivo fue comparar en el microorganismo el efecto in vitro antimicrobiano, en un estudio experimental, la muestra fueron microorganismos patógenos orales donde se nombra a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. La concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida mínima para ambos agentes se determinaron realizando una dilución de agar y una prueba de microdilución en caldo. La solución de Extracto etanólico de propóleo inhibió el crecimiento de todos los patógenos orales excepto de *P. gingivalis* y *A. Actinomycetemcomitans*, el extracto etanólico de propóleo fue más efectivo contra bacterias gram positivas que contra las gram negativas. La administración de propóleo en concentraciones apropiadas podría ser efectivo en microorganismos orales y

puede servir como una alternativa natural y enjuague bucal antimicrobiano confiable para evitar efectos secundarios de clorhexidina.

Díaz y Proaño (2011) compararon la efectividad y actividad antibacterial in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa, ubicada en el distrito de Pasco - Perú, en las diferentes concentraciones de 1%, 5% y 10% con un control positivo de digluconato de clorhexidina al 0,2% sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 ambas predominantes en la cavidad oral y más en la periodontitis. En el estudio experimental se realizó con dos tipos de muestras que fueron específicamente cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. La efectividad antibacterial la determinaron utilizando el método de difusión en el agar sobre placas petri. Los halos de inhibitorios de crecimiento se midieron con un calibrador y posteriormente fueron anotados en una ficha de registro elaborada por el investigador. Los datos se registraron y fueron analizados con las pruebas de: T de student para muestras independientes y la prueba de U de Mann Whitney. Los resultados evidenciaron que no existieron diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los halos de inhibitorios de crecimiento del extracto etanólico de propóleo al 10% y el control positivo de digluconato de clorhexidina al 0,2% ($p=0,63$) sobre la cepa de *Fusobacterium nucleatum*. No existió diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los halos de inhibitorios de crecimiento del extracto etanólico de propóleo al 5% y el control positivo de digluconato de clorhexidina al 0,2% ($p=0,81$) sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*. Mientras que en el extracto etanólico de propóleo al 10% se observó mayor efectividad antibacterial que el control positivo de digluconato de clorhexidina al 0,2% ($p=0,02$) sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*. Se concluyó que el extracto etanólico de propóleo al 10% presenta una mayor efectividad antibacteriana sobre

las dos cepas periodontopatógenas específicamente seleccionadas cuando se le compara con un control positivo de digluconato de clorhexidina al 0,2%.

Koo *et al.* (2000) investigaron y determinaron que la eficacia y actividad antibacterial in vitro del extracto etanólico propóleo y de la Árnica montana provenientes del sureste de Brasil, en el estudio de tipo experimental se utilizaron 15 bacterias orales dentro de las cuales están *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans* y *Treponema denticola*. En el estudio se evidenció que el extracto etanólico de propóleo al 10% es más efectivo frente a todas las cepas. Las cepas de *Actinomyces viscosus* y *Actinomyces naeslundii* presentaron mayor halo inhibitorio de crecimiento bacteriano que sobre las cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

Sanghani (2014) el objetivo fue comparar la clínicamente los beneficios microbiológicos de la terapia mecánica de rutina con uso coadyuvante del propóleo indio en el tratamiento de la periodontitis. Ensayo clínico se realizó con una muestra de 20 pacientes, 9 hombres y 11 mujeres de 25 a 50 años de buena salud general, se excluyó a personas que presentaban enfermedades sistémicas. Los grupos fueron asignados aleatoriamente en grupo de control (n = 20) solo recibieron tratamiento mecánico y grupo de prueba (n = 20) recibieron tratamiento mecánico y se le entregaron propóleos. En ambos grupos, se evaluaron los parámetros clínicos y las muestras de biofilm subgingival se reunieron al empezar el estudio, 15 días y un mes. Las muestras fueron cultivadas anaeróbicamente para patógenos periodontales. La administración de propóleos mostró resultados prometedores como un complemento de tratamiento mecánico en pacientes con periodontitis crónica cuando se evalúa mediante parámetros clínicos y microbiológicos.

Shabbir, Rashid & Tipu (2016) el objetivo fue determinar si los propóleos de esta dicha región poseían actividad antibacteriana contra los patógenos periodontales. En este estudio experimental la muestra fue de los patógenos *Porphyromonas asaccharolytica* (n = 9),

Porphyromonas gingivalis (n = 13), *Prevotella intermedia* (n = 9), *Prevotella melaninogenica* (n = 4). El cribado de la actividad antibacteriana del extracto de propóleos se realizó mediante ensayo de difusión de pozos de agar, se obtuvieron dos tipos de extractos utilizando dos técnicas diferentes: Extracción ultrasónica y extracción de maceración. En el resultado se observó que el extracto etanólico de propóleo de Islamabad preparado del método de extracción ultrasónica fue mayor en comparación con el extracto obtenido con maceración sobre las muestras. Los propóleos tienen una potente actividad antimicrobiana contra patógenos periodontales anaeróbicos pigmentados, esta efectividad antimicrobiana del propóleo nos da esperanza de poder usarlo en los tratamientos de las diferentes enfermedades de la cavidad oral.

Waldner-Tomic *et al.* (2014) el objetivo fue evaluar la evidencia científica sobre la eficacia de laboratorio de propóleos frente a una selección de tres especies bacterianas con alta asociación con la periodontitis y caries (*S. mutans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* y una levadura (*C. albicans*). El tipo de estudio tuvo una muestra de 28 artículos originales que coincidían con los criterios de inclusión con respecto a los tres métodos de evaluación microbiológica. Se incluyeron los estudios que utilizaron los ensayos de mínima concentración inhibitoria, mínima concentración bactericida o de difusión del agar y que investigaron el efecto del propóleo en *S. mutans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* o *C. albicans*. El resultado fue que el propóleo mostró un efecto antimicrobiano positivo, sin embargo, cuando se comparó con los controles que fueron antibióticos, antisépticos y antifúngicos, el propóleo fue menos eficaz y requirió concentraciones más altas que los compuestos de control. Se concluye que el propóleo tiene potencial, especialmente en el caso de *S. mutans*, de convertirse en un agente antiséptico, pero pueden requerirse concentraciones más altas. El producto ofrece una alternativa para los pacientes que buscan agentes complementarios y alternativas a los productos químicos sintéticos. Especialmente el uso a largo plazo.

2.3. Justificación de la investigación

Justificación teórica

En esta investigación se propone aportar a la odontología un tratamiento natural contra la enfermedad periodontal utilizando el propóleo en microorganismos que habitan en la cavidad bucal, una de las enfermedades periodontales más frecuentes es la periodontitis que es causada principalmente por *la Porphyromonas gingivalis*. Debido a su fácil recolección y bajo costo de obtención es que se propone su uso medicinal.

Justificación práctica

El uso medicinal del propóleo beneficiará a la población que padezca enfermedades periodontales dándole una alternativa ante métodos convencionales disminuyendo sus efectos colaterales conocidos de diferentes fármacos que se utilizan para el tratamiento de esta enfermedad. Debido a las diferentes propiedades, como la antimicrobiana y entre otras conocidas, del propóleo es que la presente investigación a realizar podría brindar una alternativa de tratamiento contra las patologías de la cavidad bucal.

2.4. Hipótesis

El extracto etanólico de propóleo al 20% presenta mayor eficacia antibacteriana que la clorhexidina al 0.12 % frente a *la Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

III. Objetivos

3.1. Objetivo general

Evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 24 horas.
- Determinar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 48 horas.
- Comparar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 24 horas.
- Comparar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 48 horas.
- Comparar la diferencia del crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a las 24 horas y 48 horas.

IV. Materiales y métodos

4.1 Tipo de estudio

Longitudinal, comparativo, experimental y prospectivo.

4.2 Población/Muestra y Criterios de Selección:

Población

La población de estudio estuvo conformada por *Porphyromonas gingivalis* cepa ATCC 33277

Muestra

Se realizó un estudio piloto para determinar el tamaño de la muestra mediante fórmula.

Criterios de inclusión

- Placas Petri inoculas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 que no se contaminaron después de la siembra bacteriana.
- Extracto etanólico de propóleo a concentración de 5, 10 y 20%
- Extracto etanólico de propóleo en buenas condiciones
- Cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Criterios de exclusión

- Placas Petri inoculadas con cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 que hayan sido contaminadas y/o alteraciones.
- Propóleo en mal estado antes del procedimiento
- Extracto etanólico de propóleo almacenado por más de 10 días

4.3. Variables/ Definición/ Operacionalización

Variable Dependiente

Eficacia antibacteriana: Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento bacteriano

Variable independiente

Extracto etanólico de propóleo: Sustancia natural antibacteriana

Campos de estudio

Extracto etanólico de propóleo al 5%

Extracto etanólico de propóleo al 10%

Extracto etanólico de propóleo al 20%

Clorhexidina al 0.12% (grupo control positivo)

Suero fisiológico (grupo control negativo)

Variable dependiente	Definición	Dimensión	Indicadores	Escala	Categorías
Eficacia antibacteriana	Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento de las bacterias debido a la presencia del Extracto etanólico de propóleo	Grado de inhibición del crecimiento bacteriano	- Medida del halo inhibitorio -Tiempo de cultivo	Razón	0 – 21.9 mm 0 - 24 hrs 24 - 48 hrs
Variable independiente	Porcentaje de propóleo en el Extracto etanólico de propóleo	Grado de concentración del extracto etanólico de propóleo	Porcentajes de disolución del Extracto etanólico de propóleo	Nominal	5% 10% 20%

4.4 Método/ Técnica/ Procedimiento

Método

Observación directa del halo inhibitorio.

Técnica

En el presente trabajo se utilizó un instrumento (ver anexo N° 01), que se llena con los datos recolectados por el investigador. El instrumento tiene la siguiente característica: Este instrumento tuvo la función de recolectar y registrar todos los datos obtenidos sobre la medida individual de los halos inhibitorios alrededor de cada disco embebido por el extracto etanólico de propóleo, dicha medida se realizó en milímetros, formados alrededor de cada uno los discos embebidos con extracto etanólico de propóleo. A las 24 de haber realizado la siembra se procedió a hacer las lecturas y llenado de la ficha de recolección de datos, el mismo procedimiento se realizó 48 horas después de haber iniciado el estudio experimental, tomando en cuenta:

1. Identificación de la muestra.
2. Identificación de la concentración utilizada
3. Medida en milímetros del halo de inhibición formado.

Procedimiento

Se utilizó propóleo originario de la provincia de Oxapampa, ubicada en el departamento de Pasco - Perú. La obtención fue de aproximadamente de 500 gr de propóleo en bruto. Posteriormente fue llevado al interior del laboratorio de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

En el inicio del procedimiento para obtener los extractos de propóleo se lavó la muestra de propóleo en bruto con agua destilada, luego se dejó reposar a temperatura ambiente para secarse, una vez seca la muestra, se partió en pequeñas partes para conseguir partículas de tamaño uniformes para luego hacerse fácil el proceso de la elaboración del extracto etanólico

posteriormente se procedió a pesarlo para conocer la cantidad exacta a extraer. La extracción se realizó según la metodología soxhlet, y luego se procedió a la evaporación con el rotavapor para así obtener el concentrado final.

A final se preparó tres concentraciones del extracto etanólico de propóleo, al 5%, 10% y 20%. Posteriormente fue sometido al calor en una estufa a una temperatura de 50°C para extraer el etanol y para impedir que queden residuos de etanol dentro del extracto, el cual fue eliminado totalmente. Cada una de las tres concentraciones se almacenó en frascos de color ámbar y rotulados, que inmediatamente fueron esterilizadas en autoclave por 15 minutos para su posterior experimentación.

La obtención de la muestra para el cultivo se realizó sobre agar sangre. Luego el medio se instaló en baño maría a una temperatura aproximadamente de 45-50°C durante 30 minutos posteriormente el medio se esterilizó en autoclave dejándolo enfriar. Se añadió 3ml de agar hemina-menadiona y 4 ug/ml agar de kanamicina al medio siempre estéril, así se obtuvo una cantidad poco mayor a un 1 L del medio en total finalmente se dispensó aproximadamente 20 ml por placa.

Se prepararon diluciones seriadas de la muestra en criotubos, en suspensiones 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ de BHI. Para sembrar las muestras, se tomaron 100 µl de las diluciones -1, -2 y -3, y se depositaron la última dilución en una placa de agar sangre (suplementado con hemina-menadiona y kanamicina). La muestra se esparció en la superficie del agar uniformemente con un asa de Drygalsky en la superficie del agar.

El cultivo de la cepa que estuvo en las placas sembradas se incubó en una jarra hermética cerrada conteniendo un sobre de anaerobiosis en una jarra Merck por 7 días a 37°C. En la siembra del nuevo cultivo que se obtuvo se procedió a la selección de una colonia que presentara las características requeridas en donde se realizó una resiembra y esta colonia

finalmente sirvió de inóculo el cual fue sembrado en la superficie del agar sangre mediante el método de difusión. La placa sembrada (luego de usar el método de difusión de agar) se incubó por 7 días a una temperatura de 37°C en anaerobiosis y posteriormente se procedió a la lectura de halos. La muestra fue colocada en cada una de las 15 placas petri de acuerdo a las indicaciones y finalmente se procedió a hacer la lectura para identificar especies anaerobias estrictas, el cual permitió confirmar la identidad bacteriana.

4.5. Consideraciones éticas

El autor no presenta conflicto de intereses con las marcas que se utilizará en este estudio, se respetará los códigos de ética de la Universidad Nacional Federico Villarreal. Esto estará indicado en una declaración jurada declarando que el presente trabajo no se encuentra bajo influencia de las marcas de los productos utilizados.

Respeto a la autoría de la información utilizada para el desarrollo de este trabajo de investigación, el cual será abordado mediante el uso de referencias bibliográficas

4.6. Plan de análisis

Los datos obtenidos fueron procesados en una laptop (HP CORE i5 Windows 10), mediante el programa estadístico *SPSS* 24.0 versión en español y la base de datos Excel. Los resultados que se obtuvieron fueron presentados en cuadros y gráficos de acuerdo con los objetivos señalados.

Técnicas de procesamiento de la información

Se elaboró una base de datos en una hoja de cálculo Microsoft Excel 2016, luego fue importada por el paquete estadístico *SPSS* versión 24 donde fueron analizados para responder las preguntas de investigación formuladas.

Los datos resumidos fueron presentados en tablas de clasificación consignando los valores descriptivos utilizados. También se utilizaron gráficos de cajas y bigotes para representar la distribución de los datos.

Técnicas estadísticas utilizadas

- Descriptivo:

Para el análisis del crecimiento bacteriano mediante la variable diámetro del halo inhibitorio, de naturaleza cuantitativa, se utilizaron para su resumen medidas de tendencia central como la media aritmética y mediana, valores máximos y mínimos, así como medias de dispersión como la desviación estándar.

Para su presentación se utilizaron tablas de clasificación.

- Inferencial:

Para el contraste de hipótesis de diferencia de medias; se aplicó la prueba de contrastes múltiples de Tukey (asumiendo varianzas no homogéneas) para grupos independientes mientras que para la comparación entre tiempos la prueba t de student para muestras relacionadas. Las pruebas paramétricas fueron utilizadas ya que los datos obtenidos presentaron distribución normal (ver anexo).

Todas las pruebas estadísticas fueron contrastadas a un nivel de confianza del 95% y nivel de significancia de 5%.

V. Resultados

Tabla 1

EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO					
HALO	Extracto etanólico de propóleo 24 hrs			Control	Control
	5%	10%	20%	clorhexidina al 0.12%	negativo suero fisiológico
17.9 – 18.5	73.3%	0	0	0	0
18.6 - 19	26.7%	6.7%	0	0	0
19.1 – 19.5	0	53.3%	0	0	0
19.6 - 20	0	40%	0	0	0
20.1 – 20.5	0	0	86.7%	80%	0
20.6 - 21	0	0	13.3%	20%	0
RESULTADOS	100%	100%	100%	100%	100%

La tabla 1 se puede observar que el diámetro del halo inhibitorio de la *Porphyromonas gingivalis* a las 24 horas utilizando el extracto etanólico de propóleo al 20% alcanzo un 86.7%, entre los diámetros de 20.1 – 20.5 mm, del total de la muestra. Así mismo se observa que el diámetro del halo inhibitorio de la CHX alcanzo un 80%, entre los diámetros 20.1 – 20.5 mm, del total de la muestra. No se observó reacción alguna del suero fisiológico (control negativo) frente a la *Porphyromonas gingivalis*.

Tabla 2

EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO					
HALO	Extracto etanólico de propóleo 48 hrs			Control	Control
	5%	10%	20%	positivo clorhexidina al 0.12%	negativo suero fisiológico
18 – 18.5	53.3%	0	0	0	0
18.6 - 19	46.7%	0	0	0	0
19.1 – 19.5	0	46.7%	0	0	0
19.6 - 20	0	53.3%	0	0	0
20.1 – 20.5	0	0	40%	0	0
20.6 - 21	0	0	60%	6.7%	0
21.1 – 21.5	0	0	0	33.3%	0
21.6 - 22	0	0	0	60%	0
RESULTADOS	100%	100%	100%	100%	100%

La tabla 2 se puede observar que el diámetro del halo inhibitorio de la *Porphyromonas gingivalis* a las 48 horas utilizando el extracto etanólico de propóleo al 20% alcanzo un 60%, entre los diámetros de 20.6 – 21 mm, del total de la muestra. Así mismo se observa que el diámetro del halo inhibitorio de la CHX alcanzo un 60%, entre los diámetros 21.6 – 22 mm, del total de la muestra. No se observó reacción alguna del suero fisiológico (control negativo) frente a la *Porphyromonas gingivalis*.

Tabla 3

Valores descriptivos del halo de inhibición para los grupos de estudio a las 24 horas.

Grupos	Media	IC 95%		Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior				
EEP 5%	18,33	18,14	18,53	18,30	0,35	17,9	19,0
EEP 10%	19,47	19,32	19,61	19,50	0,26	19,0	19,9
EEP 20%	20,41	20,33	20,49	20,40	0,15	20,1	20,7
CLX	21,37	21,24	21,49	21,40	0,22	20,9	21,7

EEP=Extracto etanólico de propóleo; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%;

IC: Intervalo de confianza para la media.

La tabla 3 muestra los valores descriptivos para diámetro del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 24 horas. Para el grupo EEP 5% se observó un halo de inhibición ($18.33\text{mm} \pm 0.35\text{mm}$) con una mediana de 18.3 mm, levemente menor que lo observado en el grupo EEP 10% donde el halo de inhibición fue ($19.47\text{mm} \pm 0.26\text{mm}$) con una mediana de 19.50 mm, el grupo EEP 20% presento valores del halo de inhibición de $20.41\text{mm} \pm 0.15$ con mediana de 20.4mm y el grupo CLX que presento los valores más altos con $21.37\text{mm} \pm 0.22\text{mm}$ y mediana de 21.4 mm. Este aumento progresivo de los valores del halo inhibitorio es observado en la figura III.

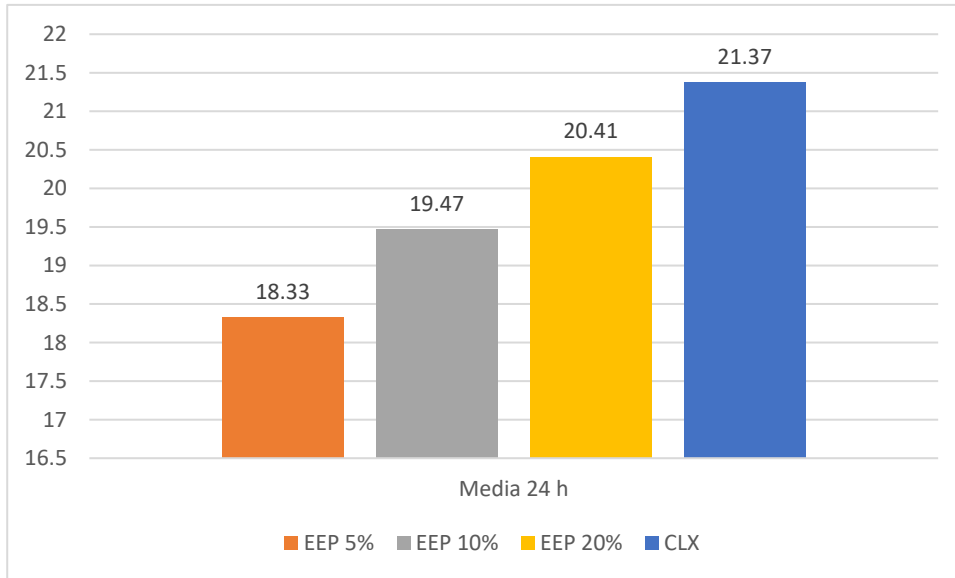


Figura III. Distribución de los valores del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 24 horas.

Tabla 4

Valores descriptivos del halo de inhibición para los grupos de estudio a las 48 horas.

Grupos	Media	IC 95%		Mediana	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
		Límite inferior	Límite superior				
EEP 5%	18,52	18,33	18,71	18,50	0,35	17,9	19,0
EEP 10%	19,60	19,50	19,70	19,60	0,19	19,3	20,0
EEP 20%	20,58	20,52	20,64	20,60	0,10	20,4	20,8
CLX	21,65	21,50	21,80	21,70	0,27	21,0	22,0

EEP=Extracto etanólico de propóleo; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%;

IC: Intervalo de confianza para la media.

La tabla 4 muestra los valores descriptivos para diámetro del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 48 horas de evaluación los valores descriptivos para diámetro del halo inhibitorio para los grupos evaluados muestra para el grupo EEP 5% valores de halo inhibitorio de $18.52\text{mm} \pm 0.35\text{mm}$ con una mediana de 18.5 mm, levemente menor que lo observado en el grupo EEP 10% donde el halo de inhibición fue de $19.6\text{mm} \pm 0.19\text{mm}$) con una mediana de 19.6mm, el grupo EEP 20% presento valores del halo de inhibición de $20.58\text{mm} \pm 0.10$ con mediana de 20.6mm y el grupo CLX que presento los valores más altos con $21.65\text{mm} \pm 0.27\text{mm}$ y mediana de 21.7 mm. Este aumento progresivo de los valores del halo inhibitorio es observado en la figura IV.

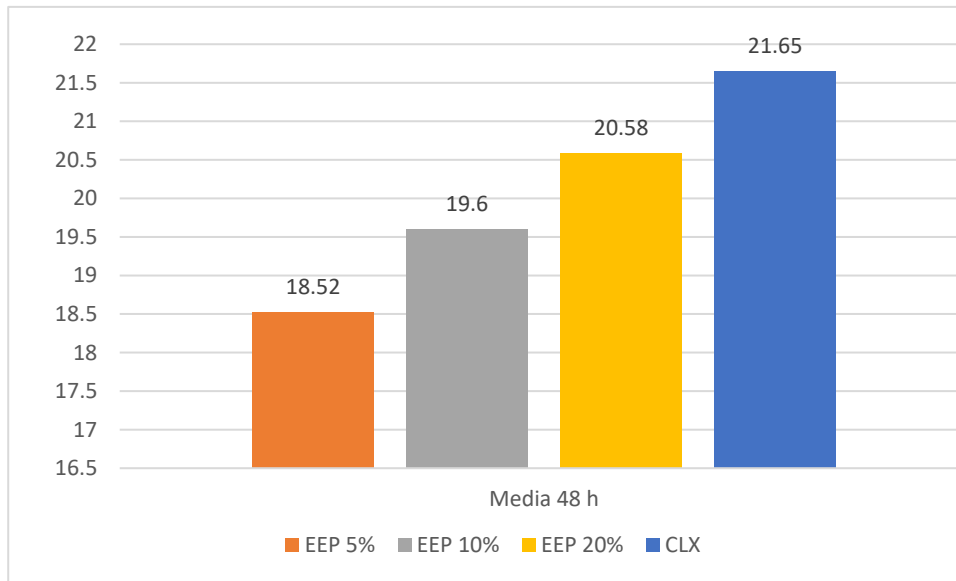


Figura IV. Distribución de los valores del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 48 horas.

Tabla 5

Comparación de medias del halo de inhibición entre tiempos dentro de cada grupo de estudio.

Grupos	Tiempos	Media	Mediana	Desviación estándar	Diferencia de medias (24h-48h)	p-valor ^a
EEP 5%	24 horas	18,33	18,30	0,35	-0,187	0,00028*
	48 horas	18,52	18,50	0,35		
EEP 10%	24 horas	19,47	19,50	0,26	-0,133	0,00038*
	48 horas	19,60	19,60	0,19		
EEP 20%	24 horas	20,41	20,40	0,15	-0,167	0,00005*
	48 horas	20,58	20,60	0,10		
CLX	24 horas	21,37	21,40	0,22	-0,287	0,00497*
	48 horas	21,65	21,70	0,27		

*Diferencias significativas ($p < 0.005$); ^aBasado en la prueba *t* de Student para muestras relacionadas.

La tabla 5 muestra el aumento observado en todos los grupos entre las 24 y 48 horas es altamente estadísticamente significativo ($p < 0.005$). La distribución de los valores del diámetro del halo inhibitorio muestra un aumento diferente tanto entre grupos como dentro de cada uno de ellos. Figura V.

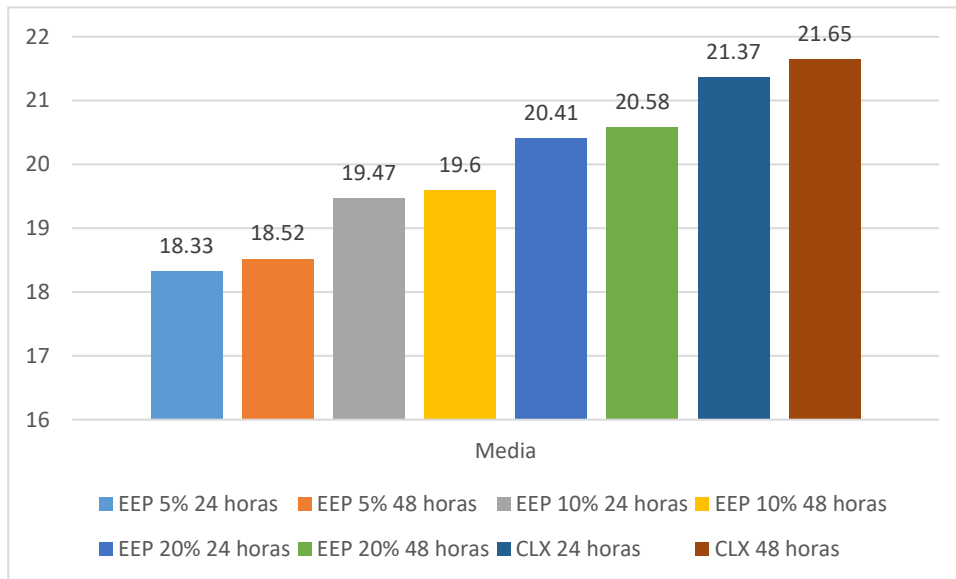


Figura V. Distribución de los valores del halo de inhibición entre las 24 y 48 horas dentro de cada grupo de estudio.

Tabla 6

Comparación de medias del halo de inhibición entre grupos de estudio a las 24 horas. Prueba de comparaciones múltiples de Tanhame.

(I) grupos	(J) grupos	Diferencia de medias (I-J)	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
EEP 5%	EEP 10%	-1,13333*	,000	-1,4544	-,8122
	EEP 20%	-2,08000*	,000	-2,3691	-1,7909
	CHX	-2,14000*	,000	-2,4382	-1,8418
EEP 10%	EEP 5%	1,13333*	,000	,8122	1,4544
	EEP 20%	-,94667*	,000	-1,1678	-,7256
	CHX	-1,00667*	,000	-1,2413	-,7720
EEP 20%	EEP 5%	2,08000*	,000	1,7909	2,3691
	EEP 10%	,94667*	,000	,7256	1,1678
	CHX	-,06000	,914	-,2340	,1140
CHX	EEP 5%	2,14000*	,000	1,8418	2,4382
	EEP 10%	1,00667*	,000	,7720	1,2413
	EEP 20%	,06000	,914	-,1140	,2340

*Diferencias de medias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$);

EEP=Extracto etanólico de propóleo; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%;

La tabla 6 muestra las comparaciones entre pares de grupos, se observa que las diferencias halladas son estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre todos los grupos evaluados (EEP 5%, 10% y 20% y CLX). Se observa que, a las 24 horas, el grupo con menor concentración del extracto etanólico de propóleo, presenta menor crecimiento bacteriano, mientras la clorhexidina, los mayores valores.

Tabla 7

Comparación de medias del halo de inhibición entre grupos de estudio a las 48 horas. Prueba de comparaciones múltiples de Tanhame.

(I) grupos	(J) grupos	Diferencia de medias (I-J)	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
EEP 5%	EEP 10%	-1,08000*	,000	-1,3751	-,7849
	EEP 20%	-2,06000*	,000	-2,3388	-1,7812
	CHX	-3,13333*	,000	-3,4569	-2,8098
EEP 10%	EEP 5%	1,08000*	,000	,7849	1,3751
	EEP 20%	-,98000*	,000	-1,1404	-,8196
	CHX	-2,05333*	,000	-2,2977	-1,8089
EEP 20%	EEP 5%	2,06000*	,000	1,7812	2,3388
	EEP 10%	,98000*	,000	,8196	1,1404
	CHX	-1,07333*	,000	-1,2951	-,8516
CHX	EEP 5%	3,13333*	,000	2,8098	3,4569
	EEP 10%	2,05333*	,000	1,8089	2,2977
	EEP 20%	1,07333*	,000	,8516	1,2951

**Diferencias de medias estadísticamente significativas ($p < 0.0001$);*

EEP=Extracto etanólico de propóleo; CLX=Solución de clorhexidina al 0.12%;

La tabla 7 muestra las comparaciones entre pares de grupos, se observa que las diferencias halladas son estadísticamente significativas ($p < 0.00001$) entre todos los grupos evaluados (EEP 5%, 10% y 20% y CLX). Del mismo modo que a las 24 horas, también a las 48 horas se observa que el grupo con menor concentración es extracto etanólico de propóleo al 5 % y la clorhexidina muestra los valores más altos de halo inhibitorio.

VI. Discusión

En estudios recientes se han demostrado que los productos naturales tienen diferentes propiedades antibacterianas que están teniendo un rol importante en la odontología para usarlos como tratamiento a diferentes enfermedades de la cavidad oral. La enfermedad periodontal es una de las patologías más comunes a nivel bucal. El propóleo, un producto natural, es motivo de investigaciones con la finalidad de utilizar sus beneficios antibacterianos para diferentes tratamientos odontológicos.

En el presente estudio realizado de tipo experimental y longitudinal se determinó que existe eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo a las diferentes concentraciones de 5%, 10% y 20% sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*. Para determinar la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de propóleo se utilizó el método de difusión de agar mediante discos sobre placas petri.

Los resultados obtenidos demuestran que las cepas de *P. gingivalis* son sensibles al contacto con el extracto etanólico de propóleo, evidenciando así diferentes diámetros de halos de crecimiento inhibitorio de 18.3 mm a las 24 hrs y 18.5 mm a las 48 hrs a la concentración del 5 %, 19.5 mm a las 24 hrs y 19.6 mm a las 48 hrs a la concentración del 10 % y 20.4 mm a las 24 hrs y 20.6 mm a las 48 hrs. Estadísticamente se evidenció diferencias significativas en los diferentes halos de inhibición a diferentes porcentajes del extracto. Para los controles se utilizaron a la clorhexidina (0.12%) como control positivo el cual también produjo halos de inhibición promedio de 21.4 mm a las 24 hrs y 21.7 mm a las 48hrs, mientras que en el grupo de control negativo se utilizó suero fisiológico el cual no ocasiono ninguna eficacia antibacteriana.

Akca *et al.* (2016) realizó un estudio en el cual su objetivo fue comparar el efecto in vitro del extracto etanólico de propóleo en bajas concentraciones sobre bacterias

periodontopatógenas dentro de las cuales se nombra a la *P. gingivalis* ATCC 33277. El extracto etanólico de propóleo inhibió el crecimiento de todos los patógenos orales excepto de la *P. gingivalis*, el extracto fue más efectivo contra bacterias gram positivas que contra las gram negativas. En el cual concluyó que la administración de propóleo en concentraciones apropiadas podría ser efectivo en microorganismos orales y puede servir como una alternativa natural y enjuague bucal antimicrobiano confiable para evitar efectos secundarios de clorhexidina. Este hallazgo difiere con nuestra investigación ya que nuestro estudio demuestra que si existe eficacia antibacteriana del extracto etanólico de propóleo frente a las cepas de *P. gingivalis*, si lo utilizamos a concentraciones adecuadas como las que se utilizaron en este estudio del cual los resultados obtenidos demostraron que fueron positivos en cuanto a la eficacia que existe de extracto frente a dicha cepa.

Díaz y Proaño (2011) comparó la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo a las diferentes concentraciones de 1%, 5% y 10% con un control positivo de digluconato de clorhexidina al 0,2% sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, en los resultados obtenidos en este estudio se demostraron que no existió diferencia estadísticamente significativa entre los promedios de los halo inhibitorio de crecimiento del extracto etanólico de propóleo al 5% y el control positivo de digluconato de clorhexidina al 0,2%, mientras que el extracto etanólico de propóleo al 10% si presentó mayor efectividad antibacteriana que el control positivo de digluconato de clorhexidina sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis*, concluyendo así que el extracto etanólico de propóleo al 10% presenta una mayor efectividad antibacteriana cuando se le compara con un colutorio comercial como lo es el digluconato de clorhexidina al 0,2%. Este hallazgo coincide con los resultados que se obtuvieron en nuestra investigación ya que los valores del estudio mencionado tienen semejanza a los obtenidos en esta investigación.

Los resultados encontrados en este estudio son favorables ya que la bacteria en estudio es predominante en la enfermedad periodontal, es importante resaltar el uso del propóleo como método alternativo natural para el tratamiento de esta enfermedad, disminuyendo así los efectos adversos de los medicamentos convencionales y los costos de adquisición de los colutorios.

VII. Conclusiones

- A las 24 horas se observó que el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo frente a la *Porphyromonas gingivalis* fue mayor a la concentración de 20 %
- A las 48 horas se observó que el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo frente a la *Porphyromonas gingivalis* fue mayor a la concentración de 20 %
- A las 24 horas se comparó el crecimiento bacteriano mediante la observación de los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo frente a la *Porphyromonas gingivalis* siendo mayor, de los tres porcentajes, la concentración de 20% obteniendo una semejanza a la de CLX al 0.12%, resaltando que la clorhexidina tuvo un efecto antibacteriano levemente mayor.
- A las 48 horas se comparó el crecimiento mediante la observación de los bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo frente a la *Porphyromonas gingivalis* siendo mayor, de los tres porcentajes, la concentración de 20% obteniendo una semejanza a la de CLX al 0.12%, resaltando que la clorhexidina tuvo un efecto antibacteriano levemente mayor.
- A las 24 y 48 horas se comparó el crecimiento bacteriano mediante la observación de los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo frente a la *Porphyromonas gingivalis* siendo mayor, de los tres porcentajes, la concentración de 20% obteniendo una semejanza a la de CLX al 0.12%, resaltando que la clorhexidina tuvo un efecto antibacteriano levemente mayor.

VIII. Recomendaciones

- Realizar investigaciones que demuestren la importancia de la medicina natural en la medicina en general y así puedan utilizarse en el campo de la odontología para tratamientos de enfermedades orales.
- Desarrollar investigaciones utilizando el extracto etanólico de propóleo sobre bacterias periodontopatógenas o diferentes microorganismos que habitan en la cavidad oral.
- Elaborar estudios que determinen las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) del extracto etanólico de propóleo.
- Elaborar estudios in vitro del extracto etanólico de propóleo a las concentraciones utilizadas en este estudio que verifiquen los resultados obtenidos o que resulten de manera similar.
- Ampliar el campo de la investigación acerca de colutorios dentales que contengan el extracto etanólico de propóleo.

IX. Referencias Bibliográficas

- Agarwal, G., Vemanaradhya, G. y Mehta, D. (2012, Julio). Evaluation of chemical composition and efficacy of Chinese propolis extract on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 3(3), 256-261. doi:10.4103/0976-237X.103614
- Akca, A., Akca, G., Toksoy, F., Macit, E., Pikköken, L. y Özgen, I. (2016). The Comparative Evaluation of the Antimicrobial Effect of Propolis with Chlorhexidine against Oral Pathogens: An In Vitro Study. *BioMed Research International*, 2016. doi:10.1155/2016/3627463
- Bagavad, J., Aishwarya, A., Pavithra, N., Chandrasekaran, S., George, V. y Gnanamani, A. (2017, Octubre). A molecular technique to explore the relationship between *Porphyromonas gingivalis* and severity of chronic periodontitis: A clinical approach. *Anaerobe*, 49, 1-4. doi:10.1016/j.anaerobe.2017.10.011
- Bascones, A. y Figuero, E. (Diciembre, 2005). Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 17(3), 147-156.
- Boyanova, L., Kolarov, R., Gergova, G. y Mitov, I. (2006, Agosto). In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 12(4), 173-177. doi.org/10.1016/j.anaerobe.2006.06.001
- Brunner, J., Scheres, N., El Idrissi, B., Deng, M., Laine, L., van Winkelhoff, J. y Crielaard, W. (2010). The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiology*, 10(5), 1-11. doi.org/10.1186/1471-2180-10-5

- Burdock, A. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347-363. doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2
- De Paula, A., Gomes, R., Santiago, W., Dias, R., Cortes, M. y Santos, V. (2006). Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to brazilian green propolis extract. *Pharmacologyonline*, 3, 467-473.
- Díaz, J. y Proaño, D. (Marzo, 2011). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. *Revista Estomatologica Herediana*, 21(3), 125-130. doi:10.20453/reh.v21i3.214
- Díaz, J., Yáñez, J., Melgar, S., Álvarez, C., Rojas, C. y Vernal, R. (Marzo, 2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin.Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 5(1), 40-45. doi.org/10.4067/S0719-01072012000100007
- Eley, M., Soory, M. y Manson, D. (2012). *Periodoncia*, Reino Unido:ISBN.
- Holt, C., Kesaval, L., Walker, S. y Attardo, C. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, 20, 168-238. doi:10.1111/j.16000757.1999.tb00162.x
- Huang, S., Zhang, P., Wang, K., Li, G. y Hu, L. (2014, Noviembre). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19. doi:10.3390/molecules191219610
- Infantes, R. y Millones, P. (Noviembre, 2015). Efectividad antimicrobiana del propóleo frente a bacterias periodontopatógenas. In *Crescendo. Ciencias de la Salud*, 2(2), 567-573.

- Koo, H., Gomes, B., Rosalen, P., Ambrosano, G., Park, Y. y Cury, J. (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol*, 45(2), 141-148. doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00117-X
- Kuropatnicki, K., Szliszka, E. y Krol, W. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi:10.1155/2013/964149
- Lindhe, J., Lang, P. y Karring, T. (2011). *Periodontologia Clinica e Implantologia Odontologica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial MédicaPanamericana.
- Lopez, J. y Ubillus, M. (2004). *Estandarización del propóleos de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial*(tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Marsh, D. y Martin, V. (2011). *Microbiología Oral: Amolca*.
- Martinez, I. (2006). *Actividad biocida de un propolis chileno frente a Porphyromonas gingivalis: Estudio in vitro* (tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago de Chile.
- Mayta-Tovalino, F., Sacaquispe, S., Ceccarelli, J. y Alania, J. (2012). Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. *Revista Estomatológica Herediana*, 2(1), 50-58. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421539367009>
- Naverac, M., de Grado, P. y Gil, F. (2007). Uso de colutorios en la clínica periodontal. *Periodoncia y Osteointegración*, 17(1), 41-52.
- Negrori, M. (2009). *Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía de práctica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

- Orrego, M., Parra, A., Salgado, P., Muñoz, E. y Fandiño, V. (2015). *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *Rev. CESOdont*, 28(1), 57-73.
- Ramos, D., Moromi, H. y Martínez, E. (2011). *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontología Sanmarquina*, 14(1), 34-38.
- Sanghani, N. (2014, Septiembre). Health from the Hive: Propolis as an Adjuvant in the Treatment of Chronic Periodontitis - A Clinicomicrobiologic Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(9), 41-44. doi:10.7860/JCDR/2014/8817.4856
- Sardana, D., InduShekar, K., Manchanda, S., Gupta, B. y Sheoran, N. (2013, Septiembre). Role of propolis in dentistry: review of the literature. *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 18(3), 118-125. doi:10.1111/fct.12034
- Shabbir, A., Rashid, M. y Tipu, H. (2016, Julio). Propolis, A Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens. *Cureus*, 8(7), 682. doi:10.7759/cureus.682
- Toreti, C., Sato, H., Pastore, M. y Park, K. (2013). Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi:10.1155/2013/697390
- Valdebenito, M. (2014). Caracterización de aislados clínicos de *Porphyromonas gingivalis* y su efecto en la viabilidad de células epiteliales gingivales. Universidad de Chile, Santiagode Chile.
- Wagh, D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013. doi:10.1155/2013/308249
- Waldner-Tomic, N., Vanni, R., Belibasakis, G. N., Thurnheer, T., Attin, T. y Schmidlin, R. (2014, Julio). The in Vitro Antimicrobial Efficacy of Propolis against Four Oral Pathogens: A Review. *Dentistry Journal*, 2, 85-97. doi:10.3390/dj2030085

Zerón, A. (2018). La nueva clasificación de enfermedades periodontales. *Revista ADM*, 75(3), 122-124.

X. Anexos

Anexo n° 1 Ficha de datos

N° PLACA	MEDIDA DE HALO DE INHIBICIÓN EN LA PLACA AGAR SANGRE ENRIQUECIDA CON HEMINA-MENADIONA Y KANAMICINA				
	Extracto etanólico de propóleo			Control positivo clorhexidina al 0.12%	Control negativo suero fisiológico
	5%	10%	20%		
Cultivo N°1					
Cultivo N°2					
Cultivo N°3					
Cultivo N°4					
Cultivo N°5					
Cultivo N°6					
Cultivo N°7					
Cultivo N°8					
Cultivo N°9					
Cultivo N°10					
Cultivo N°11					
Cultivo N°12					
Cultivo N°13					
Cultivo N°14					
Cultivo N°15					

Anexo n° 2 Matriz de Consistencia

TITULO: EFICACIA ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO FRENTE A LA *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

	Objetivo	Hipótesis	Variables	Metodología
¿Cuál es la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de propóleo frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> in vitro?	<p>General: Evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277.</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>-Determinar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 a las 24 horas.</p> <p>-Determinar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 a las 48 horas.</p> <p>-Comparar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 a las 24 horas.</p> <p>-Comparar el crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 a las 48 horas.</p> <p>-Comparar la diferencia del crecimiento bacteriano mediante los halos inhibitorios del extracto etanólico de propóleo al 5%, 10%, 20% y clorhexidina al 0.12% frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 a las 24 horas y 48 horas.</p>	<p>El extracto etanólico de propóleo al 20% presenta mayor eficacia antibacteriana que la clorhexidina al 0.12 % frente a la <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277</p>	<p>Variable dependiente: Eficacia antibacteriana</p> <p>Variable Independiente: Extracto etanólico de propóleo</p> <p>Población: La población de estudio estuvo conformada por <i>Porphyromonas gingivalis</i> cepa ATCC 33277</p> <p>Unidad de análisis: 1 placa Petri inoculada con cepa de <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277</p>	<p>Tipo de investigación: Prospectivo, longitudinal, experimental, comparativo.</p> <p>Muestra: Se realizó un estudio piloto para determinar el tamaño de la muestra mediante la fórmula.</p> <p>Muestreo: Probabilística de asignación aleatoria por grupos</p>

Anexo n° 3 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk

Análisis de normalidad de los datos entre grupos de estudio

Tiempo	Grupos	Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	p-valor ^a
24 horas	EEP 5%	,927	15	,243
	EEP 10%	,962	15	,726
	EEP 20%	,950	15	,528
	CLX	,949	15	,511
48 horas	EEP 5%	,953	15	,569
	EEP 10%	,945	15	,445
	EEP 20%	,916	15	,165
	CLX	,905	15	,113

^aDistribución normal ($p > 0.05$)

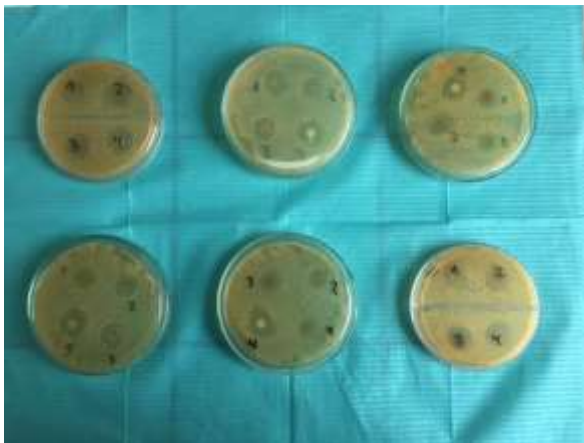
Anexo n° 4 Prueba de Homogeneidad de Levene

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
HALO	Se basa en la media	6,713	3	56	,001
24H	Se basa en la mediana	5,570	3	56	,002
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	5,570	3	50,145	,002
	Se basa en la media recortada	6,527	3	56	,001

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
HALO	Se basa en la media	5,468	3	56	,002
48H	Se basa en la mediana	4,904	3	56	,004
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,904	3	39,859	,005
	Se basa en la media recortada	5,306	3	56	,003

Anexo n° 5 Fotos

- Placas petri inoculadas con *Porphyromonas gingivalis* y embebidos con discos de extracto etanólico de propóleo a las 24 y 48 hrs.



- Medición de los halos inhibitorios.

