



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
ESTOMATOLOGÍA**

TESIS

**COMPARACIÓN *in vitro* DEL EFECTO
ANTIBACTERIANO ENTRE EL HIPOCLORITO
DE SODIO Y EL EXTRACTO HIDROETANÓLICO
DE PROPÓLEO CONTRA *Enterococcus faecalis*
ATCC 29212**

**PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA**

Autor:

Estela Gaitán Samir Alexis

Asesora:

Dra. La Serna Solari Paola Beatriz

Línea de Investigación:

Respuestas biológicas aplicadas en terapias

**Pimentel – Perú
2019**

Comparación *in vitro* del efecto antibacteriano entre el hipoclorito de sodio y el extracto hidroetanólico de propóleo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Autor:

Estela Gaitán Samir Alexis

Filiación institucional: Escuela Profesional Académica de Estomatología, Facultad de Ciencia de la Salud, Universidad Señor de Sipán.

Asesor:

Dra. Paola Beatriz La Serna Solari

Presidente

Mg. Mblgo. López López Elmer

Secretario:

Blgo. Zamora Mejía Luz Amalia

Vocal:

Mg. CD. Espinoza Plaza José José

DEDICATORIA

A Dios quién me guía, día a día con su infinita sabiduría, conocimientos e inspiración en mi preparación profesional.

A mi adorada madre Vercelia Gaitán Díaz, por su inmenso y dedicado sacrificio que me sirven de ejemplo para lograr mis metas.

A mi querido padre Helí Estela Rimarachín, por haber inculcado a sus hijos, valores morales y saber valorar el sacrificio de ellos.

A mis hermanas Mirella del Milagro Estela Gaitán y Lesly Estela Gaitán, por su alentadora inspiración, su comprensión y porque siempre estarán a mi lado cuando los necesite.

AGRADECIMIENTOS

Mi Asesor ay profesora CD. Paola La Serna Solari, quién me dio la confianza, al darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia, responsabilidad, por sus enseñanzas y sobre todo por compartir su tiempo para la culminación del presente trabajo.

Al jurado integrado por la Mg. Mblgo. Elmer López López, Blga Luz Amalia Zamora Mejía, y al Mg. CD. Espinoza Plaza José José, por sus correcciones oportunas y completa disposición en la evaluación del trabajo.

A todos mis docentes que me formaron y me orientaron en la parte investigativa y como ejemplo de imagen docente en sus enseñanzas en mi formación como profesional.

Resumen:

Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del hipoclorito de sodio y extracto hidroetanólico de propóleo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Se evaluó el efecto en 5 grupos distribuidos en concentraciones de 100 %, 50% y 25 % de extracto hidroetanólico de propóleo e hipoclorito de sodio al 5 % y al 3 %. Se hicieron 5 repeticiones por grupo experimental. La sensibilidad bacteriana se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer. El espécimen bacteriano fue reactivado en caldo nutritivo, para inocularlo en cultivo Agar Cerebro Corazón. Al enfrentar el microorganismo a los extractos hidroetanólicos, se obtuvo halos promedios de inhibición de 7,3 mm para el propóleo al 100 % y 10.05 mm para el hipoclorito de sodio al 5%. Se concluye que los extractos hidroetanólicos del propóleo al 100 % presentó sensibilidad nula y el hipoclorito de sodio al 5% presentó sensibilidad límite sobre *E. faecalis* ATCC 29212

Palabras clave: *Enterococcus faecalis*, Propóleo, extracto

Abstract:

In vitro comparison of the antibacterial effect between sodium hypochlorite and the hydroethanolic extract of propolis against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. The effect was evaluated in 5 groups distributed in concentrations of 100%, 50% and 25% of the hydroethanolic extract of propolis and hypochlorite of sodium at 5% and 3%. Five repetitions were made per experimental group. Bacterial sensitivity was evaluated using the Kirby-Bauer method. The bacterial specimen was reactivated in nutritious broth, to inoculate it in heart agar culture. When facing the microorganism to the hydroethanolic extracts, average inhibition halos of 7.3 mm were obtained for propolis at 100% and 10.05 mm for 5% sodium hypochlorite. It is concluded that the hydroethanolic extract of propolis 100% showed no sensitivity and 5% sodium hypochlorite showed limit sensitivity on *E. faecalis* ATCC 29212

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Propolis, extract

INDICE

Resumen

Abstract

I.	Introducción	1
1.1	Situación problema	1
1.2	Trabajos previos	3
1.3	Teorías relacionadas al tema	6
1.4	Formulación del problema	17
1.5	Justificación e importancia del estudio	17
1.6	Hipótesis	17
1.7	Objetivos	18
1.7.1	Objetivo General:	18
1.7.2	Objetivo Específicos:	18
II.	Material y Métodos	18
2.1	Tipo y Diseño de Investigación.....	18
2.2	Población y muestra	18
2.3	Variables, Operacionalización	18
2.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.	19
2.4.1	Técnicas	19
2.4.2	Instrumento de recolección de datos	22
2.5	Métodos de análisis de datos.	22
2.6	Aspectos éticos.	22
III.	Resultados	23
3.1	De la actividad antibacteriana	23
3.2	Discusión y Recomendaciones	24
IV.	Conclusiones	26
	Referencias	27
	Anexos	30

I. Introducción:

1.1. Realidad Problemática.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, refieren que del 60%-90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo y que las enfermedades periodontales graves, que pueden desembocar en la pérdida de dientes, afectan a un 15%-20% de los adultos de edad media (35-44 años) y alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y los 74 años no tiene dientes naturales, además que las dolencias bucodentales, tanto en niños como en adultos, tienden a ser más frecuentes entre los grupos pobres y desfavorecidos (1). Así mismo se ha demostrado a través de los aportes la Microbiología y la ciencia endodóntica para llegar a descifrar los tratamientos que se pueden emplear para combatir al biofilm, a nivel el metabolismo microbiano y las estrategias que ellos mismos utilizan para resistir y permanecer ocultos pero activos, como responsables de lesiones periapicales refractarias (2).

Además, la complejidad y la variabilidad del sistema del conducto radicular, junto con la naturaleza multiespecífica de las biopelículas, hacen que la desinfección de este sistema sea sumamente difícil. La persistencia microbiana parece ser el factor más importante para la falla del tratamiento del conducto radicular y esto podría tener un impacto adicional en el dolor y la calidad de vida (3). Por otro lado, se reporta que *Enterococcus faecalis* sea la principal especie bacteriana presente en los tratamientos fallidos del conducto radicular, sobrevive después del tratamiento endodóntico ingresando a un estado viable pero no cultivable (VBNC) (4).

Por tanto, a través del tiempo, se han utilizado diferentes agentes terapéuticos para poder controlar el crecimiento y contaminación microbiana, en consecuencia en la actualidad existen productos naturales que son empleados, como el caso del propóleo que ha servido como una barrera protectora de colmenas contra la contaminación microbiana, es así que este producto de las abejas se ha utilizado en medicina folklórica como un antiséptico, soporte del sistema inmunológico y una cura para las contusiones, infecciones de la boca y garganta, cáncer, inflamación, enfermedades cardiovasculares, infecciones respiratorias y muchos otros (5,6)

Por tal motivo se formuló de la interrogante ¿Cuál es la diferencia entre el efecto antibacteriano *in vitro* del hipoclorito de sodio y el extracto hidroetanólico de propóleo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212? Siendo posible el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico del propóleo sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, además que pueda presentar variaciones en sus concentraciones a evaluar en comparación con el Hipoclorito de sodio, se programó el presente estudio cuyo objetivo es, Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* entre Hipoclorito de sodio y el extracto hidroalcohólico de Propóleo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, esto por medio del método de Kirby-Bauer.

A través de la evaluación del perfil de microbiota cultivable en pacientes con infección endodóntica secundaria antes de una desinfección fotoactivada, mediante secuenciación del gen 16S rRNA se identificaron bacterias anaerobias estrictos en un 25,8% tales como *Veillonella parvula* (9,6%), *Propionibacterium acnes* (6,4%), *Porphyromonas gingivalis* (3,2%), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (3,2%) y *Lactobacillus acidophilus* (3,2%) y también bacterias anaeróbicas facultativos en un 74,2% como *Enterococcus faecalis* (35,4%), *Actinomyces naeslundii* (3,2%), *L. rhamnosus* (3,2%), *L. casei* (3,2%), *Streptococcus sanguinis* (3,2%) y *S. mitis* (3,2%), además, se detectó *Candida albicans* (19,3%) y después de la desinfección persistieron *V. parvula* (33,3%), *E. faecalis* (33,3%) y *C. albicans* (33,3%) (7).

Otros estudios revelan que existen varios microorganismos relacionados con infecciones endodónticas inclusive la presencia de levaduras en los conductos radiculares con necrosis pulpar los microorganismos principales que se han aislado antes de un tratamiento de conducto incluyen bacilos anaeróbicos Gram-negativos, cocos anaerobios Gram-positivos, bacilos anaeróbicos Gram-positivos y facultativos (especies sacarolíticas tales como muchos tipos de *Prevotella* y especies asacarolíticas tales como *Porphyromonas*, además *Tannerella forsitia*, *Dialister*, *Fusobacterium*, espiroquetas), especies de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, por el contrario, las bacterias facultativas como *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* no mutantes pueden sobrevivir a la instrumentación quimio-mecánica y a la irrigación del conducto radicular (8). Además, otros estudios revelan la presencia de microorganismos tales como *Fusobacterium nucleatum* (71,6%), *Dialister pneumosintes* (58,3%) y *Tannerella forsythia* (48,3%) y *Enterococcus faecalis* no es considerado como la especie más prevalente y asimismo se

encuentran asociados *T. forsythia* y *Porphyromonas gingivalis* en los extremos de la raíz (9).

Otro estudio reveló la presencia de *Enterococcus faecalis* en infecciones periodontales con un índice dental cariado, obturado, perdido (COP) promedio de 18.17 ± 3.59 ; *E. faecalis* positivos con un índice de 18.22 ± 4.41 (10).

A menudo se han desarrollado y optimizado agentes antimicrobianos para su actividad contra las bacterias endodónticas. Un irrigante ideal del conducto radicular debe ser biocompatible, debido a su contacto cercano con los tejidos periodontales durante el tratamiento endodóntico. El hipoclorito de sodio (NaOCl) es uno de los irrigantes endodónticos más ampliamente recomendados y utilizados, pero es altamente tóxico para los tejidos periapicales (8).

1.2. Trabajos previos:

Dantas *et al.* (2017). El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos *in vitro* antioxidantes, antimicrobianos, antiparasitarios y citotóxicos de extractos de propóleos rojos, verdes y marrones de diferentes regiones de Brasil, obtenidos por métodos de extracción etanólica y supercrítica. La mayoría de los extractos demostraron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Ninguno de los extractos analizados mostró actividad contra *Escherichia coli* o *Candida albicans*. Se observó un efecto inhibitorio de todos los extractos etanólicos probados en el crecimiento de los epimastigotes de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi* en las primeras 24 h. Sin embargo, después de 96 h, se detectó un efecto inhibitor persistente solo para muestras de propóleos rojos. Los efectos biológicos de los extractos etanólicos de propóleos rojos revelados en el presente estudio sugieren que el propóleo rojo puede ser un posible tratamiento terapéutico alternativo contra la enfermedad de Chagas y algunos tipos de cáncer, aunque la alta actividad del propóleo rojo *in vitro* debe confirmarse en el futuro *in vivo* investigaciones (6).

Ghasemi *et al.* (2017). El propósito de este estudio fue verificar la actividad del extracto de propóleo en aceite contra algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Fue un estudio experimental, la actividad antimicrobiana del extracto de propóleo en aceite con diferentes concentraciones de etanol, metanol y dimetilsulfóxido como diluyentes contra diferentes especies de bacterias. En las pruebas de difusión de agar, utilizando pocillos

que contienen suspensión de propóleo con metanol / dimetilsulfóxido / etanol por pocillos, algunas bacterias fueron más sensibles al efecto de las preparaciones de propóleos. No se mostró ninguna zona de inhibición del crecimiento en la prueba de difusión de agar con discos de papel impregnados con suspensión de metanol / dimetilsulfóxido. La evaluación de los resultados del examen mostró que la efectividad del extracto frente a las bacterias puede explicarse por el hecho de que el efecto del propóleo oleoso fue estadísticamente significativo por la introducción de metanol y dimetilsulfóxido (11).

Bucio y Martínez (2017). En el presente estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo. Se colectó el propóleo en un apiario ubicado en Irapuato, Guanajuato, México. 300 g de propóleo fueron fraccionados y adicionados a 500 ml de etanol al 70%, en agitación continua por quince días. Por filtración al vacío, se separó la fase líquida, y el etanol contenido en ella fue evaporado en un rotoevaporador accionado a noventa revoluciones por minuto (rpm) y 80 °C. El residuo final fue resuspendido en agua destilada, obteniéndose así el extracto acuoso. Un extracto de propóleo obtenido con etanol concentrado fue utilizado como control de referencia, además se incluyeron controles de etanol y agua. La actividad antibacteriana de los extractos fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar, utilizando cepas de *Escherichia coli* (ATCC-10536), *Salmonella typhimurium* (ATCC-13311), *Listeria monocytogenes* (ATCC-19115) y *Staphylococcus aureus* (ATCC-11632), desarrolladas en tripticaseína-soya-agar, incubadas a 37 °C por veinticuatro horas y se midió el halo de inhibición al término de dicho tiempo. Solo el extracto etanólico usado como control tuvo actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*, más no se encontró respuesta para *E. coli* y *S. typhimurium*. El extracto acuoso no tuvo efecto sobre ninguna de las cuatro bacterias evaluadas, concluyéndose que los ingredientes activos del propóleo no son solubles en agua, por lo que se pierden en un proceso de extracción acuosa (12).

Harfouch, Mohammad y Suliman, (2017). El objetivo fue evaluar la eficacia del propóleo sirio en algunas cepas bacterianas aisladas del Hospital Al-Assad en Latakia para estimar su actividad antimicrobiana. Dos muestras de propóleos de dos regiones en la costa de Siria y preparados con extractos etanólicos de propóleos (EEP) con diferentes concentraciones (0.5%, 1%, 5%, 10% y 20%), se emplearon en cuatro cepas

de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*), utilizando el método de difusión en pozo en agar Muller Hinton. Las bacterias mostraron una susceptibilidad diversa a los extractos y la bacteria más susceptible fue *Staphylococcus aureus*, que fue sensible a todas las concentraciones y especialmente para EEP 20%. Sin embargo, las bacterias menos afectadas fueron *E. coli* y *Pseudomonas*, ya que el EEP del 0,5% y el 1% no tuvo eficacia. Por otro lado, hubo pocas diferencias en la actividad antimicrobiana entre las dos muestras de propóleos (13).

Runyoro, Ngassapa y Kamugisha (2017), Este estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de dos muestras de propóleos de Iringa y Tabora, Tanzania. Los extractos etanólicos de las dos muestras de propóleos se probaron contra microorganismos estándar, incluidas bacterias Gram + y Gram - y levaduras por determinación de CMI utilizando el método de microdilución en caldo. El sinergismo con gentamicina también se evaluó para una de las muestras. Además, se determinaron los perfiles de HPTLC de los extractos y la presencia de flavonoides. Las dos muestras de propóleos mostraron actividad variada frente a los microorganismos ensayados con CMI que oscilaban entre 0,42 y 6,67 mg/mL, siendo el propóleo de Tabora más activo que el propóleo de Iringa. *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo más susceptible, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* fue el más resistente. El propóleo también potenciaba la actividad de la gentamicina. Ambas muestras dieron positivo para los flavonoides. Sin embargo, hubo algunas diferencias en sus perfiles de HPTLC. Recomendamos estudios adicionales que incluyan más muestras de propóleos de diversas regiones de Tanzania para verificar más a fondo la actividad observada y el sinergismo (5).

Boufadi *et al.* (2016). Este estudio tuvo como objetivo estudiar el efecto antimicrobiano del propóleo y determinar los compuestos esenciales que le dan la actividad antimicrobiana. Se investigó el efecto antimicrobiano para seis extractos de acetato de etilo de propóleos (EAP) recolectados de diferentes regiones de Argelia en cuatro cepas patógenas (*Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*) y dos cepas beneficiosas (*Bifidobacterium animalis* y *Lactobacillus rhamnosus*). Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que los diferentes EAP mostraron posibles efectos inhibitorios en cepas patógenas probadas con valores de concentración

inhibitoria mínima variable de 0,3 y 9 mg/mL, mientras que las bacterias beneficiosas mostraron resistencia contra EAP de propóleos. Los resultados también demostraron que los compuestos de flavonoides tienen valores de CMI muy bajos, mientras que los compuestos de ácido fenólico tienen valores de CMI variables de 1-10 mg/mL. Estos resultados indicaron que el propóleo contiene sustancias comprobadas con actividad antimicrobiana y son un prelude de las investigaciones dirigidas al empoderamiento de la sustancia de abejas como fuente potencial de agentes antimicrobianos con múltiples salidas (14).

Atta, Alotibi y Elhwimal (2016). El presente estudio tuvo como objetivo investigar la actividad antimicrobiana de extractos acuosos y solventes de propóleos en algunas bacterias y hongos de importancia médica. Se evaluaron los extractos acuosos calientes y fríos, además de los sucesivos extractos de solventes (acetona, etanol y extractos de cloroformo de propóleos) por su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans* por método de difusión en agar. El extracto de cloroformo mostró una actividad antibacteriana significativa contra *Escherichia coli* seguida de acetona y luego el extracto de etanol finalmente el extracto acuoso caliente. Donde el extracto acuoso frío no mostró importancia contra *Escherichia coli*. El extracto más eficaz mostró actividad antimicótica alta significativa fue el extracto acuoso frío contra *Candida albicans*, luego el extracto acuoso caliente, finalmente el extracto de etanol. Mientras que los extractos de acetona y cloroformo no mostraron actividad antifúngica significativa contra *Candida albicans*. También el extracto acuoso caliente mostró una actividad antibacteriana altamente significativa contra *Staphylococcus aureus* y luego el extracto de etanol. Mientras que los otros extractos no mostraron ninguna actividad antibacteriana significativa en su contra. Por lo tanto, se podría concluir que el extracto de propóleo exhibió una notable actividad antimicrobiana contra patógenos microbianos y puede introducirse como una alternativa a los medicamentos antimicrobianos químicos, pero requirió una investigación más amplia (15).

Bini, de Baura, Funayama (2010). El objetivo de este trabajo fue establecer un método de preparación de extracto acuoso para mostrar una mayor actividad antibacteriana. Se preparó una solución acuosa de compuestos solubles extraídos de propóleos mediante tratamiento alcalino. En el estudio de la actividad antibacteriana, utilizando el método

de dilución en agar, se utilizaron bacterias gram-positivas de importancia médica como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* y gram-negativos como *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto acuoso del compuesto soluble en propóleos fue capaz de inhibir el crecimiento de todas las bacterias ensayadas. Se determinó la concentración inhibidora mínima de 36 g/ml para *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y de 9 g/mL para *Staphylococcus aureus* (16).

1.3. Marco teórico:

A) Modelo Teórico Celular de *Enterococcus faecalis*

Los enterococos son cocos gram positivos, que se encuentran aislados, de a pares, o formando cadenas cortas. Ellos pertenecieron, clásicamente, a los *Streptococcus* grupo D de Lancefield; sin embargo, a mediados de la década de 1980 fueron oficialmente clasificados en su propio género. Son catalasa negativa, anaerobios facultativos, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas. Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9,6. Tienen la capacidad de hidrolizar la esculina, crecer en presencia de bilis al 40%, sobrevivir 30 min a 60°C e hidrolizar la L-pirrolidonil β-naftil-amida (PYR); esta habilidad ha sido usada como parte de un test rápido para detección de enterococos en el laboratorio.

Las especies de enterococos clínicamente importante son: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. solitarius*, *E. pseudoavium*. *E. faecalis* es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos de enterococos. *E. faecium* es la segunda especie aislada en frecuencia, representando el 5% al 16% de los aislamientos clínicos (17).

1. Sustancia de agregación (SA)

SA o sus siglas en inglés AS, es una proteína superficial inducible por feromonas grande de *E. faecalis*, que se sabe que está implicada en la agregación bacteriana mediante la unión a la sustancia de unión enterocócica (EBS). Hasta ahora, se han

identificado tres proteínas AS diferentes (Asa1, Asc10 y Asp1), cada una codificada por su propio plásmido conjugativo sensible a feromonas (pAD1, pCF10 y pPD1, respectivamente). Juntos comprenden una familia de adhesinas superficiales que son casi idénticas en la mayor parte de la proteína, con la excepción de un pequeño segmento variable con una identidad compartida de aproximadamente 30 a 40% (17).

Asc10 parece ser la proteína AS más estudiada en relación en endocarditis infecciosa (IE) por *E. faecalis*, con cuatro artículos incluidos investigando el papel de esta proteína en particular, en comparación con un artículo que investiga Asa1 y no artículos identificados investigando Asp1.

Asc10 está codificado por el gen prgB de pCF10 y se han descrito varios dominios funcionales de la proteína, entre estos, un N-terminal y un dominio de agregación central, así como un N-y C-terminal Arg-Gly-Asp (RGD) motivo.

Se utilizó un modelo de endocarditis de conejo para investigar el papel de Asc10 y EBS con *E. faecalis*. Descubrieron que la combinación de la Asc10 y la expresión de EBS no solo aumentaba la letalidad, sino que también evitaba la inflamación pericárdica. Más tarde, se investigó las funciones individuales de diferentes dominios funcionales de Asc10 en *E. faecalis*. Utilizando un modelo de endocarditis de conejo, encontraron que una cepa con mutaciones en ambos motivos de RGD mostraba virulencia que era esencialmente equivalente a la de una cepa que portaba el alelo nulo de prgB. Además, las mutaciones a cualquier motivo RGD solo, revelaron que el motivo RGD N-terminal parece ser más importante para la virulencia que el motivo RGD C-terminal. La interrupción del dominio de agregación dio como resultado cepas que eran menos virulentas que la cepa de tipo salvaje, pero más virulenta que la doble mutante de RGD (18).

En un estudio posterior, usaron un modelo de válvula cardíaca porcina ex vivo para evaluar el papel de Asc10 en la adherencia bacteriana y la formación de biopelículas en los primeros momentos del tiempo. Descubrieron que las cepas, independientemente de la expresión de Asc10, podían unirse e iniciar el desarrollo de la biopelícula en las válvulas cardíacas con colonización similar durante las primeras dos horas. Sin embargo, después de cuatro horas, se descubrió que la cepa Asc10- coloniza las válvulas a solo 40% del nivel de la cepa Asc10 +. Además, observaron que las micro colonias de la cepa Asc10 + eran grandes, que contenían cientos de bacterias y

abundante matriz extracelular (ECM), mientras que la cepa Asc10⁻ producía micro colonias más pequeñas, con menos ECM. También evaluaron la contribución de los dominios funcionales anteriormente mencionados de Asc10 con respecto a la adherencia inicial y la formación de biopelículas y encontraron que varias de las mutaciones tenían efectos menos severos en su modelo de válvula ex vivo en comparación con el modelo de endocarditis in vivo (18).

2. Hemolisina

La hemolisina enterocócica está codificada en el plásmido pAD1 sensible a las feromonas, el mismo plásmido que también codifica la proteína AS Asa1. Usaron un modelo de endocarditis de conejo para evaluar las cepas que expresaban hemolisina y / o Asa1. Observaron una mortalidad del 55% en el grupo hemolisina + Asa1 +, una mortalidad del 15% en el grupo hemolisina-Asa1 + y una mortalidad del 0% en el grupo hemolisina + Asa1⁻. Además, encontraron que las cepas Asa1 + producían vegetaciones con pesos que variaban de 181-209 mg, mientras que las cepas Asa1⁻ producían vegetaciones con pesos que variaban de 81-92 mg (18).

3. Pared celular con Glucolípidos.

Los estudios han demostrado que las cepas mutantes de *E. faecalis* con síntesis de glicolípidos deteriorados o eliminados muestran una formación de biopelículas deteriorada, un proceso que se sabe juega un papel crucial en Endocarditis infecciosa. Dos glucosiltransferasas de *E. faecalis*, denominadas síntesis de glicolípidos asociados a la biopelícula A y B (bgsA y bgsB, respectivamente), son responsables de la biosíntesis de los dos glicolípidos principales de la pared celular, diglicosil-diacilglicerol y su precursor monoglicósido diacilglicerol (18).

Se ha demostrado que la deficiencia de BgsA conduce a una pérdida de diglicósil-diacilglicerol en la membrana celular y a una acumulación de monoglicosil-diacilglicerol, mientras que la deficiencia de bgsB conduce a una pérdida completa de los glicolípidos de la membrana celular (18).

En 2014, evaluó la importancia de los glicolípidos en Endocarditis infecciosa por *E. faecalis*. Utilizando un modelo de endocarditis en ratas, compararon cepas mutantes, deficientes para bgsA o bgsB, con una cepa de tipo salvaje parental. Encontraron que las

dos cepas mutantes estaban atenuadas, en comparación con la cepa de tipo salvaje, produciendo vegetaciones que pesaban menos y contenían significativamente menos UFC por mililitro y por gramo. El mutante *bgsB* exhibió el nivel más alto de atenuación (18).

4. Proteína general de estrés 24 (*gls24*)

Gls24 es una proteína sintetizada en *E. faecalis* durante condiciones de estrés tales como inanición de glucosa y exposición al cloruro de cadmio o sales biliares. comparó un mutante de disrupción *gls24* con su cepa de tipo salvaje parental (OG1RF). Utilizando un modelo de endocarditis de rata con infección mixta, encontraron que OG1RF superaba en número a la cepa *gls24*, constituyendo el 77% y el 84% del total de bacterias recuperadas de los cultivos a las 72 y 120 horas, respectivamente. Las mezclas iniciales de inyección usadas para los experimentos contenían 36% y 43% de OG1RF, respectivamente. Los investigadores también calcularon el índice medio de virulencia de la cepa *gls24*- en relación con OG1RF y lo encontraron como 0.18 y 0.09 a las 72 y 120 horas, respectivamente (18).

5. Endocarditis y Biofilm-Asociado Pili (*Ebp*) de *E. faecalis*

Pili y fimbriae son organelos de proteína fibrosa, anclados a la superficie de la bacteria, que interactúan con el ambiente externo. Se sabe que son utilizadas por algunas bacterias para lograr la adhesión a las células hospedadoras. En 1981 se informaron estructuras similares a las fimbrias en la superficie de *E. faecalis*, y hoy en día se sabe que su ensamblaje depende de un locus de *EbpABC* de tres genes y un gen de clasificación génica asociado, *srtC*. Se han encontrado altos títulos de anticuerpos contra las proteínas *EbpABC* presentes en el suero de pacientes que sufren *E. faecalis* IE, lo que indica que son fácilmente expresados y reconocidos por el sistema inmunitario del huésped durante la infección (18).

En el 2006 evaluaron el papel del grupo de genes *EbpA-srtC* en la formación de biopelículas, el inicio de la Endocarditis infecciosa. Descubrieron que las mutaciones dentro del grupo de genes *EbpA-srtC* reducían notablemente la capacidad de las cepas para formar biopelículas. Además, un ensayo de unión in vitro de dos horas reveló diferencias significativas en la unión inicial, con la cepa parental de tipo salvaje (OG1RF) exhibiendo un mayor número de células adherentes por campo microscópico, que cualquiera de las cepas mutantes. Por último, los investigadores utilizaron un

modelo de endocarditis de rata de infección mixta, en el que inyectaron a las ratas con la misma mezcla de un mutante EbpA no pilado y OG1RF. Encontraron que el porcentaje medio del mutante EbpA en la UFC total de bacterias recuperadas de las vegetaciones después de 24 horas fue del 26,1% y calculó que el índice de virulencia promedio del mutante EbpA en relación con OG1RF era de 0,06 (18).

6. Gelatinasa (GelE)

GelE es una metaloproteasa de zinc extracelular que se cree que contribuye a la virulencia a través de la degradación de los sustratos del huésped, como el colágeno, el fibrinógeno, la fibrina y los componentes del complemento C3 y C3a, entre otros. Es una de las dos proteasas de *E. faecalis*, y la otra es serina proteasa (SprE) (18).

En el 2010 se trató de dilucidar la contribución relativa de cada proteasa a *E. faecalis* IE comparando *E. faecalis* V583 resistente a la vancomicina con tres cepas mutantes que carecían de GelE y / o SprE.

También evaluaron si alguna de las dos proteasas poseía actividad proteolítica hacia el componente C5a del complemento.

Utilizando un modelo de endocarditis de conejo, no encontraron diferencias significativas en las cargas bacterianas en las válvulas cardíacas para ninguna de las cepas analizadas. Sin embargo, una evaluación de la UFC media por gramo de tejido cardíaco, reveló una reducción de 14 y 7,2 veces para las cepas GelE- SprE + y GelE- SprE- en comparación con V583. Por el contrario, observaron un aumento de 6,5 veces en la UFC media por gramo de tejido cardíaco para la cepa GelE + SprE- en comparación con la cepa GelE- SprE +. Por último, los investigadores encontraron que GelE es capaz de hidrolizar C5a (18)

7. Adhesina al colágeno de *E. faecalis* (Ace)

El Ace, es una adhesina anclada en la pared celular, que se ha demostrado que es antigénica durante endocarditis infecciosa por *E. faecalis* y que desempeña un papel vital en la adherencia in vitro de *E. faecalis* al colágeno inmovilizado. Se sabe que las válvulas cardíacas, el tejido aórtico y las vegetaciones estériles son sitios que contienen colágeno (18).

En el 2010 se evaluó el papel de Ace en *E. faecalis* en endocarditis infecciosa, utilizando un ensayo de adherencia in vitro así como modelos de endocarditis mixta y monoinfección de rata. Ensayaron cuatro cepas diferentes; OG1RF (cepa de tipo salvaje parental), OG1RF Δ ace (Como una delección mutante), pAT392: ace (Ace deletion mutant que contiene un vector lanzadera con un gen Ace clonado) y pAT392 (Ace deletion mutant, que contiene un vector de lanzadera vacío). Los porcentajes de células que expresan Ace en cultivos de OG1RF, OG1RF Δ ace, pAT392 y pAT392: ace fueron >70%, <5%, <5% y >90%, respectivamente. En el ensayo de adherencia encontraron que las dos cepas Ace (OG1RF Δ ace y pAT392) estaban altamente atenuadas, en comparación con OG1RF, y aún más en comparación con pAT392: ace, en adherencia al colágeno tipo I y IV. Para evaluar la importancia de Ace in vivo, los investigadores utilizaron un modelo de endocarditis de rata de infección mixta, en el que se inyectó a las ratas una mezcla 1: 1 de OG1RF y OG1RF Δ ace. Después de 72 horas, recuperaron las bacterias de las válvulas y encontraron que el porcentaje medio de OG1RF Δ ace en la UFC total era 18.5%, lo que corresponde a un índice de virulencia promedio de OG1RF Δ ace en relación con OG1RF de 0.077. Por último, querían evaluar el papel de Ace en la etapa temprana de la unión de la válvula de colonización. Para ello, compararon los resultados de dos modelos independientes de monoinfección, en los cuales las ratas fueron desafiadas con pAT392 o pAT392: ace. Encontraron que después de cuatro horas, las vegetaciones valvulares de ratas infectadas con pAT392: ace contenían $1,4 \pm 0,6 \log_{10}$ más UFC/media geométrica, que las vegetaciones valvulares de ratas infectadas con pAT392 (18).

8. Proteína A de unión a fibronectina enterocócica (EfbA)

EfbA es una adhesina, localizada en la superficie externa de *E. faecalis* que confiere adhesión a la fibronectina inmovilizada (18).

La fibronectina es una glicoproteína que, entre otros lugares, se puede encontrar en la matriz extracelular del endotelio cardíaco. Está expuesto si el tejido cardíaco se daña, luego se une a la fibrina y las plaquetas, contribuyendo así a la formación de una vegetación estéril (18).

En 2015 se trató de evaluar el papel de EfbA en *E. faecalis* IE. Utilizando un ensayo basado en una placa de microtitulación, demostraron que el EfbA recombinante (rEfbA)

muestra una unión dependiente de la concentración para la fibronectina humana inmovilizada, así como alta afinidad por el colágeno I y V. Además, mostraron que se mostró un mutante de delección EfbA (TX5707) una disminución del 44% en la unión de las células enteras a la fibronectina inmovilizada en comparación con la cepa parental de tipo salvaje (OG1RF). Una cepa derivada, en la que el gen de EfbA había sido restaurado en su ubicación cromosómica original (TX5708), mostraba una unión celular completa a la fibronectina inmovilizada similar a la de OG1RF. Cuando se examinó su capacidad para formar biopelículas, se encontró que TX5707 producía biopelículas con una densidad reducida del 15% en comparación con OG1RF y TX5708. Para evaluar la contribución de EfbA a *E. faecalis* IE, los investigadores utilizaron un modelo de endocarditis mixta de rata infectada. Primero, inyectaron ratas con una mezcla 1: 1 de OG1RF y TX5707 y después de 48 horas, se encontró que el porcentaje medio de TX5707 en la UFC total de bacterias recuperadas de las válvulas era del 25%. A continuación, inyectaron las ratas con una mezcla de 59% de TX5707 y 41% de TX5708 y después de 48 horas, se encontró que el porcentaje medio de TX5707 en el total de CFU de bacterias recuperadas de las válvulas era de aproximadamente 37% (18).

9. Eep

Eep es una metaloproteasa de membrana, conocida por su papel en el procesamiento proteolítico de los péptidos de feromonas sexuales que, una vez madurados, inducen la conjugación en una clase de plásmidos conjugativos que responden a las feromonas grandes, como pCF10 y pAD1 (18).

En el 2011 usaron un modelo de endocarditis de conejo en el que probaron una versión libre de plásmidos de OG1RF y una cepa mutante Eep (OG1RF Δ eep) para evaluar el papel de Eep en *E. faecalis* en una endocarditis infecciosa. Encontraron que OG1RF Δ eep exhibió una disminución de 4 log₁₀ en la carga bacteriana de la válvula en comparación con OG1RF. Además, observaron que OG1RF Δ eep produjo pequeñas vegetaciones con un peso promedio de 8.8 mg, mientras que OG1RF produjo grandes vegetaciones con un peso promedio de 47.6 mg. Los investigadores también evaluaron una cepa que se había complementado con el locus Eep de tipo salvaje en trans en un plásmido. Encontraron que la cepa complementada producía vegetaciones con un peso promedio de 32.1 mg, a pesar del hecho de que solo el 2% de las células retenía el plásmido al final del experimento (18).

10. Biofilm Formación y Mantenimiento

Es un proceso de biopelícula en las válvulas cardíacas. Una biopelícula es esencialmente una comunidad microbiana/microcolonia multicelular, surgida de la adherencia de organismos planctónicos, que luego típicamente sintetizan una matriz extracelular, lo que ayuda a estabilizarlos físicamente (18).

Tres factores de virulencia identificados parecen estar involucrados en la formación de biopelículas durante *E. faecalis* IE. Se observó que Asc10 contribuyó al establecimiento de grandes microcolonias que contenían abundante matriz extracelular, se encontró una nueva forma mutante de EbpA que producía biopelículas con una densidad similar a la de uno no formador de biopelículas y un mutante EfbA producía biopelículas con una densidad reducida del 15% en comparación con su cepa parental (18).

Se sabe que la formación y la acumulación de la vegetación modifican tanto el crecimiento como el estado fisiológico de las bacterias, lo que a su vez impide la eficacia de los antibióticos y el sistema inmune del huésped y, por lo tanto, es ventajoso para las bacterias. Curiosamente, parece que la degradación controlada de la vegetación puede hacerla aún más ventajosa. La proteasa GelE parece estar involucrada en este proceso a través de la degradación de la capa de fibrina. La degradación mediada por GelE parece estar diluyendo la biopelícula, por lo que se vuelve lo suficientemente inestable como para que las piezas se desprendan y se embolicen, sin diluirse tanto que las bacterias encubiertas se vuelvan expuestas y vulnerables. Esta hipótesis surge de Thurlow, et al., 2010, quienes encontraron que una mutación a GelE no causó una reducción significativa en la carga bacteriana en las válvulas, pero disminuyó notablemente el número total de UFC por gramo de tejido cardíaco, lo que indica una disminución de las bacterias diseminación. Además, a través del examen histológico, encontraron que la capa de matriz de las vegetaciones aórticas infectadas por los mutantes GelE era 10 veces más gruesa en comparación con la capa de vegetación infectada por la cepa parental (18).

B) Propóleo

1. Características:

El propóleo es de naturaleza lipófila, dura y frágil y se vuelve suave, flexible, gomoso y muy pegajoso cuando se calienta. Posee un olor aromático característico y agradable y varía en color de amarillo verde a rojo y a marrón oscuro dependiendo de su origen y edad. Según el origen de las resinas, también varía de amarillo a marrón oscuro. Pero incluso el propóleo transparente ha sido reportado (19).

2. Composición.

El propóleo es una mezcla compleja producida por compuestos liberados de abejas y derivados de plantas. En general, el propóleo en bruto está compuesto por aproximadamente 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de diversos compuestos orgánicos. Se identificaron más de 300 constituyentes en diferentes muestras y se reconocen otros nuevos durante la caracterización química de nuevos tipos de propóleos. Las proporciones de las diversas sustancias presentes en el propóleo dependen de su lugar y momento de recolección (19).

Se han utilizado muchos métodos analíticos para la separación e identificación de los constituyentes del propóleo y las sustancias identificadas pertenecen a los siguientes grupos de compuestos químicamente similares: polifenoles; Ácidos benzoicos y derivados; alcohol cinámico y ácido cinámico y sus derivados; sesquiterpeno e hidrocarburos triterpénicos; derivados de benzaldehído; otros ácidos y derivados respectivos; alcoholes, cetonas y compuestos heteroaromáticos; terpeno y sesquiterpeno alcoholes y sus derivados; hidrocarburos alifáticos; minerales; esteroides e hidrocarburos esteroideos; Azúcares y aminoácidos. Como puede esperarse, los compuestos volátiles (producidos por las plantas de origen) están presentes en cantidades bajas. Se cree que los azúcares se introducen accidentalmente durante la elaboración del propóleo y / o el paso de las abejas sobre la resina. Algunos compuestos son comunes en todas las muestras de propóleos y determinan sus propiedades (19).

El propóleo de diferente origen contiene diferentes constituyentes. Algunos constituyentes están presentes en muchas muestras de diferentes lugares (19).

El diferente origen geográfico de la muestra de propóleos varía con su actividad biológica debido a diferentes condiciones climáticas. Los compuestos principales esenciales responsables de las actividades biológicas son los polifenoles, los ácidos aromáticos y los ácidos diterpénicos, pero muy pocos tipos diferentes de propóleos han sido diferentes en sus principales compuestos bioactivos. La composición diferente también está relacionada con la flora específica de la región y los tratamientos de la materia prima (19).

3. Punto de fusión

El propóleo es suave, flexible y sustancia pegajosa a 25 °C a 45 °C. Particularmente, en estado congelado, se vuelve duro y quebradizo. Seguirá siendo frágil después de dicho tratamiento incluso a temperaturas más altas. Por encima de 45 °C, se volverá cada vez más pegajoso y gomoso. El propóleo se volverá líquido a 60 °C a 70 °C, pero para algunas muestras, el punto de fusión puede ser tan alto como 100 °C (19).

4. Solubilidad del propóleo

Teniendo en cuenta la estructura compleja del propóleo, no se puede usar directamente. El propóleo se extrae comercialmente con un disolvente adecuado. Los solventes más comunes utilizados para la extracción son agua, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter y acetona. Muchos de los componentes bactericidas son solubles en agua o alcohol, que deben eliminar el material inerte y conservar los compuestos deseados. La composición del propóleo depende de la región geográfica y el segundo método de extracción, el disolvente debe elegirse cuidadosamente. Los principales solventes utilizados para la extracción de compuestos bioactivos y otros compuestos químicos extraídos se da a partir de solventes orgánicos (19).

5. Actividad antibacteriana

La propiedad antimicrobiana del propóleo recolectada de Gujarat mediante el método de difusión en agar contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Asparagus niger*. Los extractos etanólicos de la muestra (conc. 200 m/mL) mostraron una alta actividad antibacteriana

contra Gram-positivo, es decir, *Bacillus subtilis*, pero menor actividad contra bacterias Gram-negativas (*P. aeruginosa* y *E. coli*) (19).

La levadura *C. albicans* mostró una zona de inhibición moderada, mientras que *A. Niger* no mostró ninguna actividad. Sin embargo, lo menos fue en los extractos metanólicos al 40%. (19).

1.1. Formulación del Problema.

¿Cuál es la diferencia entre el efecto antibacteriano *in vitro* del hipoclorito de sodio y el extracto hidroetanólico de propóleo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212?

1.4. Justificación:

En la actualidad, microorganismos relacionados con infecciones endodónticas y muchos de ellos están involucrados en infecciones primarias o secundarias, tratándose de erradicar con diferentes agentes terapéuticos y, que en ocasiones han sido fallidos por la resistencia que puede generar como tal es *Enterococcus faecalis*, como también se ha visto influenciado con su capacidad de proliferación y en la formación de biopelículas en la estructura del diente.

En relación al empleo del propoleo, otros estudios han permitido evidenciar su capacidad inhibitoria sobre diferentes microorganismos gram positivos y gram negativos, aun así los resultados pueden variar dependiendo de su composición química y la metodología, lo que sugiere que existe una relación entre el propoleo y su actividad antimicrobiana. En nuestro medio, no existen reportes de trabajos que revelen el efecto inhibitorio del propoleo procedente de la región Lambayeque sobre *Enterococcus faecalis*.

Por tal motivo la ejecución del presente estudio a través de los resultados servirán para determinar si el extracto hidroalcoholico de Propoleo, tiene efecto antibacteriano, teniendo con ello la posibilidad de incentivar otros estudios destinados a, la preparación de posibles colutorios con principios bioactivos obtenidos de propóleo.

1.2. Hipótesis.

El hipoclorito de sodio 5% y el extracto hidroetanólico de Propoleo existe diferencia en el efecto antibacteriano *in vitro* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

1.5. Objetivos.

General

- Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* del hipoclorito de sodio y extracto hidroetanólico de propóleo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Específicos

- Evaluar efecto antibacteriano, *in vitro*, del extracto hidroetanólico del propóleo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del hipoclorito de sodio 5% contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del hipoclorito de sodio 3% contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

II. Material y Métodos:

2.1 Tipo y Diseño de Investigación.

Para el presente proyecto de investigación se empleará el tipo de investigación cuantitativa, con diseño experimental de estímulo creciente (20).

2.2 Variables, Operacionalización.

Variable Independiente: Extracto de hidroalcoholico de Propoleo/hipoclorito de sodio

Variable Dependiente: Efecto antibacteriano

Operacionalización

Variable dependiente	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Valor final	Tipo de variable	Escala
Efecto antibacteriano sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Sustancia que inhibe el crecimiento o reproducción de bacterias	Sensibilidad bacteriana medida mediante el método de posillos	Zona o Halo de inhibición nula (-) menor o igual 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm sumamente sensible (S.S. = +++) si será igual o superior a 20 mm.(23)	mm	Cuantitativa	De razón
Variable independiente	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Valor final	Tipo de variable	Escala
Extracto de propóleo	Líquido cocentrado, utilizando solventes alcohol y agua.	Diluciones de propóleo usando como solvente orgánico al etanol al 70%	Concentraciones	100% 50% 25%	Catagórica	Ordinal
Hipoclorito de sodio	Compuesto químico altamente oxidante. que suele ser llamado también cloro o lejía.	Disolución de sales en agua blanda.	Concentraciones	5% 3%	Catagórica	Ordinal

2.3 Población y muestra.

Para el presente trabajo se empleó una cepa de la especie de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, la muestra fue de 9 y estará conformada por (3 concentraciones de extracto, 3 tipos de agentes (Hipoclorito 5% / Hipoclorito 5% / hidroetanol) y 1 cepa, pero como se realizarán 5 repeticiones, se obtiene 45 unidades experimentales.

2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

Método de Kirby-Bauer

Método de difusión en agar es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. (21).

Procedimiento para la recolección de datos

Colección de la muestra de Propoleo

Para la colección del propóleo se siguieron las orientaciones Mayta y Sacsquispe, (2010) (22). Se recolectó en el distrito de Olmos, Provincia de Lambayeque.

- El propóleo fue recolectado con la ayuda de una espátula, mediante condiciones de higiene, para evitar la contaminación.
- El propóleo fue recolectado en los meses de enero y febrero.
- Se separaron restos de madera, hojas y otros.
- Se recolectaron aproximadamente 5 g de propóleo

Transporte

- Se transportó en frascos de vidrio estériles de boca ancha de 250 mL.

Preparación del extracto hidroetanólico de Propoleo

- El propoleo fue cortado en trozos pequeños y posteriormente fue triturado en mortero de porcelana.
- Se maceraron 5 g de Propóleo y se agregaron 100 mL de alcohol al 70 %.
- El producto fue filtrado con papel filtro Whatmann N° 40, se obtuvo un extracto purificado libre de residuos.
- El extracto resultante fue distribuido en placas petri y fue secado en hornilla a una temperatura de 50°C hasta sequedad (Anexo N° 1).
- El residuo seco obtenido posteriormente fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su reactivación en agua destilada estéril para su posterior uso

Actividad Antibacteriana

Preparación del inóculo

a. Colonias para el inóculo

Las colonias aisladas fueron seleccionadas de un cultivo en placa de agar cerebro corazón después de 24 horas (23).

Preparación de la suspensión del inóculo (23).

- De la placa de agar, se seleccionó de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia se tocó con un asa y se transfirió a un tubo con 4-5 mL de caldo Müller-Hinton.
- Con ayuda del espectrofotómetro a longitud de onda a 625 nm se ajustó la turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland, con absorbancias de 0,08 – 0,1 para bacterias.
- La suspensión bacteriana resultante contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ (UFC/mL).

De la Siembra (23)

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, una torunda de algodón se sumerge en ella. La torunda debe ser rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inoculó la superficie de una placa de agar Cerebro-Corazón por rayado con la torunda sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60° cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.

Método Kirby-Beuer

Sobre las placas sembradas:

- Se confeccionaron 5 discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, con un sacabocado.
- Se colocaron 50 μL en cada disco, con ayuda de una micropipeta, las concentraciones del extracto hidroetanólico de Propoleo.
- Cada pozo fue marcado con su respectiva identificación, se selló con parafilm y se incubó las placas a 37°C , por un periodo de 24 horas. }

Lectura e interpretación de resultados

- Después de 24 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento.
- Los tamaños de las zonas de inhibición fueron medidos con un Vernier en milímetros y fueron interpretados según orientaciones del CLSI (23).
- La actividad se considerará en función al diámetro del HICM (24): nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

III. Resultados:

Tabla 1.

Comparación el efecto antibacteriano in vitro del hipoclorito de sodio y extracto hidroetanólico de propóleo contra Enterococcus faecalis ATCC 29212

	Propoleo 100 %	Hipoclorito 5 %	P
Halos de inhibición (mm)	7,1	11,12	0,000
	7,11	9,19	
	8,3	9,54	
	6,24	10,53	
	7,53	9,85	

Fuente: Datos proporcionador por el investigador

En la Tabla 1: Para la comparación del efecto antinbacteriano *in vitro* entre el extracto hidroetanólico del Propóleo y el Hipoclorito al 5 %, obtuvo las mediciones de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano expresados en milímetros. Para la comparación del efecto antibacteriano se empleó una prueba t student para muestras independientes, se obtuvo un valor P menor que el nivel de significancia ($P < 0,05$).

Tabla 2.

Evaluación del efecto antibacteriano de las concentraciones del extracto hidroetanólico Propoleo contra Enterococcus faecalis ATCC 29212

	100 %	50%	25%	P
Halos de inhibición (mm)	7,1	0	0	0,000
	7,11	0	0	
	8,3	0	0	
	6,24	0	0	
	7,53	0	0	

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

En la Tabla 2: Se evaluó el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico del propóleo, se obtuvo efecto a la concentración del 100 %, pero de acuerdo a los estudios realizado CLS (23) no tiene efecto bactericida.

Las mediciones del halo de inhibición del crecimiento bacteriano, a través de un análisis de varianza se obtuvo un valor menor que el nivel de significancia ($P < 0,05$)

Tabla 3.

Evaluación del efecto antibacteriano del Hipoclorito al 5% contra Enterococcus faecalis ATCC 29212

	Hipoclorito 5 %	P
Halos de inhibición (mm)	11,12 9,19 9,54 10,53 9,85	0,000

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

En la Tabla 3: Se evaluó el efecto antibacteriano del hipoclorito de sodio al 5%, se obtuvo efecto, de acuerdo a las mediciones del halo de inhibición del crecimiento bacteriano, a través de un análisis de varianza se obtuvo un valor menor que el nivel de significancia ($P < 0,05$)

Tabla 4.

Evaluación del efecto antibacteriano del Hipoclorito al 3% contra Enterococcus faecalis ATCC 29212

	Hipoclorito 3 %
Halos de inhibición (mm)	0 0 0 0 0

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

En la Tabla 4: Para la evaluación del efecto antibacteriano del hipoclorito al 3%, no se obtuvo halos de inhibición de crecimiento bacteriano.

IV. Discusión:

De todas las 19 especies de enterococos presentes en el género *Enterococcus*, *E. faecalis* es la que desempeña el papel más importante en odontología, además que son resistentes a la mayoría de los antibióticos y pueden causar enfermedades tales como periodontitis, periimplantitis, faringitis, otitis, meningitis, endocarditis, infecciones del tracto urogenital e incluso condiciones sépticas (25). Por otro lado es de frecuente hallazgo en *E. faecalis* en canales radiculares de dientes con endodoncias fallidas implica que esta especie está íntimamente involucrada en la patogénesis y la persistencia de la periodontitis apical (26).

En este estudio se encontró que el propóleo al 100 % y el hipoclorito de sodio al 5% presentaron efecto antibacteriano. La cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC29212 presentaron una sensibilidad nula y sensibilidad límite en concordancia a la escala de Duraffourd (24).

En la investigación halos inhibición de crecimiento promedio de 7,3 mm para el propóleo al 100 % y 10.05 mm para el hipoclorito de sodio al 5%, por otro lado Ghasemi *et al.*, encontraron halos de 10mm para el solvente DMSO y 13 mm para el solvente metanol. Esta diferencia, sugiere que el tipo de solvente pueden influir en la sensibilidad de *E. faecalis* como también la solubilidad de compuestos antibacteriales presentes en el propóleo (11). Inclusive en Dantas *et al.*, encontraron variabilidad del efecto antibacteriano de extractos etanólicos de propóleo dependiendo del color contra *Enterococcus sp* ATCC2912, empleando concentraciones desde 31.3 hasta 1000 µg/mL (6).

Además otros estudios del efecto antibacteriano in vitro del propóleo contra bacterias gram negativas y gram positivas, revelaron poder antibacteriano contra *S. aureus*, *Salmonella*, pero sin efecto frente a *E. coli* (12). En otro estudio encontraron que el extracto etanólico de propóleo mostraron efecto antibacteriano a concentraciones del 20 %, presentando zonas de inhibición variables desde 12 mm hasta 22 mm, independientemente del tipo de bacteria (13).

Con la presente investigación se puede corroborar que el extracto hidroetanólico presentó sensibilidad nula en comparación del hipoclorito de sodio al 5 % sensibilidad límite, corroborando con los antecedentes, sugiere que el tipo de solvente orgánico

participa en la liberación de los principios antibacterianos presentes en el propóleo, además la temporada de cosecha y lugar de formación del propóleo, contribuyen a que se pueda generar mayor actividad antibacteriana (14,22).

V. Conclusiones:

Se concluye que:

- El hipoclorito de sodio al 5% tiene efecto de sensibilidad límite, *in vitro*, frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- El extracto hidroetanólico propóleo al 100%, no presentó efecto antibacteriano *in vitro* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- El Hipoclorito de sodio al 3% no presentó efecto antibacteriano *in vitro* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
-

VI. Recomendaciones

Se recomienda:

- Realizar una caracterización química del extracto hidroetanólico del propóleo para futuras investigaciones.
- Realizar ensayos in vitro con líneas celulares para descartar citotoxicidad.
- Realizar estudios con propóleo y hipoclorito de sodio con otros microorganismos

VII. Referencias:

1. OMS| Salud bucodental [Internet]. 2012 [Citado 14 de octubre del 2017]
Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
2. Zambrano S, Salcedo-Moncada D, Petkova- Gueorguieva M, Ventocilla M. Biofilm en Endodoncia: una Revisión. *Odontol. Sanmarquina*. 2016; 19(2): 45 - 49
3. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daoood U, Khan AU, Yan A, Pan GS. Biofilms in Endodontics Current Status and Future Directions. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18: 1748 - 1761
4. Jiang JEYT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Genetics and Molecular Research*. 2015; 14(4): 14790 – 14801
5. Runyoro DKB, Ngassapa OD, Kamugisha A. Antimicrobial Activity of Propolis from Tabora and Iringa Regions, Tanzania and Synergism with Gentamicin. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2017; 7 (01): 171-176
6. Dantas RP, Souza BA, de Abreu G³, Serra S, Andrade LN, Guimarães R, Carvalho AA, Ferreira F, Viana JD, Umsza-Guez MA. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts *Plos One*. 2017; 30: 1 - 18
7. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Parker S, Chiniforush N, Bahador A. The evaluation of cultivable microbiota profile in patients with econdary endodontic infection before and after photo-activated disinfection. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017; 18: 198–203
8. Borzini L, Condò R, De Dominicis P, Casaglia A, Cerroni L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis* *The Open Dentistry Journal*, 2016, 10, 692-703
9. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Ávila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe*. 2017; 48: 12 - 18
10. Ardila CM, Maggiolo S, Dreyer E, Armijo J, Silva N. *Enterococcus faecalis* en dientes con periodontitis apical asintomática. *AMC [Internet]*. 2014; 18 (4): 415 - 423.
Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552014000400007&lng=es.

11. Ghasemi FS, Eshraghi SS, Andalibi F, Hooshyar H, Kalantar- Neyestanaki D, Samadi A, Fatahi-Bafghi M. Anti-Bacterial Effect of Propolis Extract in Oil Against Different Bacteria. *Zahedan J Res Med Sci.* 2017; 19(3): 7219 - 7225.
12. Bucio-Villalobos CM, Martínez-Jaime OA. Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agron. Mesoam.* 2017; 28(1):223-227.
13. Harfouch RM, Mohammad R, Suliman H. Antibacterial activity of syrian propolis extract against several strains of bacteria in vitro world journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. 2017; 6 (2): 42 - 46
14. Boufadi YM, Soubhye J, Neve J, Van Antwerpen P, Riazi A. Antimicrobial effects of six Algerian propolis extracts. *International Journal of Food Science and Technology.* 2016; 51(12): 2613 - 2620
15. Atta RM, Alotibi NS, Elhwimal NS. Microbiological studies on propolis extracts against some animal pathogens. *JIPBS.* 2016; 3(4): 80-84
16. Bini PB, de Baura VA, Funayama S. Antibacterial Activity of Aqueous Extract of *Appis mellifera* Propolis from the City of Ibaity, PR. *Cient Ciênc Biol Saúde.* 2010; 12(4): 33 - 36
17. Pinheiro ET1, Mayer MPA. *Enterococcus faecalis* in Oral Infections. *J Interdiscipl Med Dent Sci.* 2014; 3(1): 1 - 5
18. Madsen KT, Skov MN, Gill S, Kemp M. Virulence Factors Associated with *Enterococcus faecalis* Infective Endocarditis: A Mini Review *The Open Microbiology Journal,* 2017; 11: 1 – 11
19. Wagh VD. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences.* 2013; 1 - 11
20. Hernández R, Fernández C, Baptisita P. Metodología de la Investigación. 6ta Edició. Mexico: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2014. 689 p.
21. Valgas C, Machado S, Smânia EFA, Smânia AJr. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007; 38: 369-380
22. Mayta FR, Sacsquispe S. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). *Rev Estomatol Herediana.* 2010; 20(1): 19 -24

23. Clinical and Laboratory Standards Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición. 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8
24. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. 2001; 62(2): 156 – 161
25. Karayashveva D, Radeva E. Importance of Enterococci (*Enterococcus faecalis*) for Dental Medicine – Microbiological Characterization, Prevalence and Resistance. International Journal of Science and Research. 2017; 6(7): 1970 - 1975
26. Rodriguez-Niklitsschek C, Oporto G. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literature. Rev. Odont. Mex. 2015; 19(3): 181 - 186

Anexos

Anexo N° 01

Obtención del extracto hidroetanólico de Propóleo



1
Macerado en Etanol al
70%



2
Filtrado



3
Secado



4
Extracto hidroetanólico

Fig. 1. Extracto hidroetanólico de Propoleo
Anexo 2

Preparación de las concentraciones del extracto hidroetanólico e de propóleo

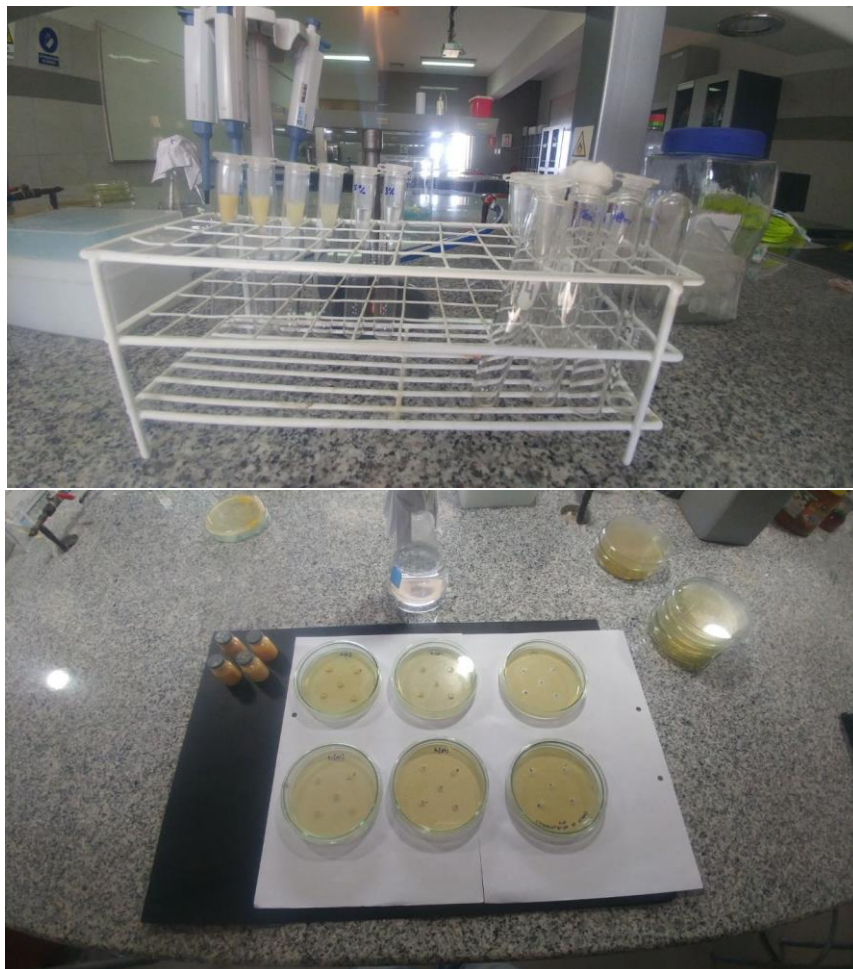
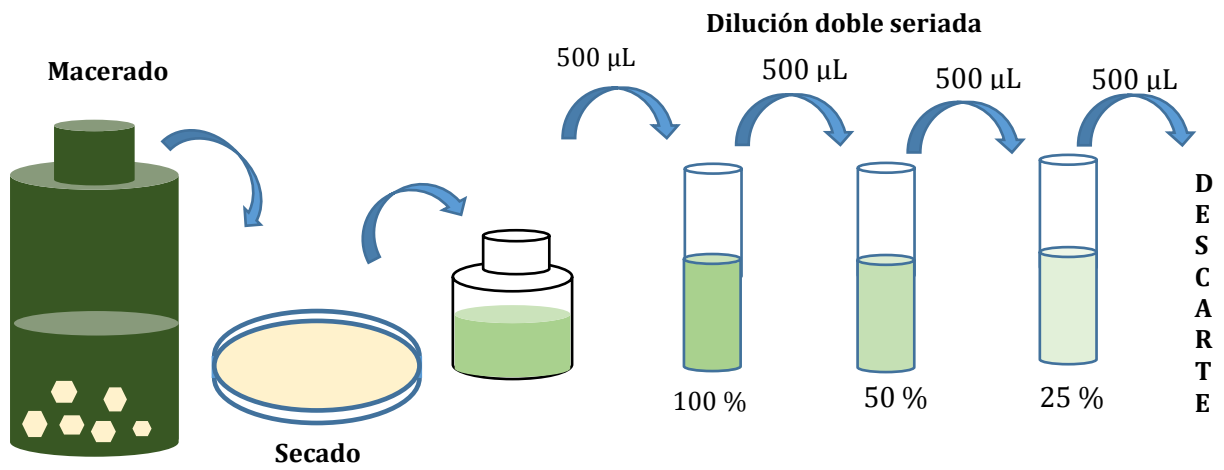


Fig. 2. Preparación de las concentraciones del extracto hidroetanólico e de propóleo y hipoclorito de sodio al 5 % y 3 %

Anexo 3

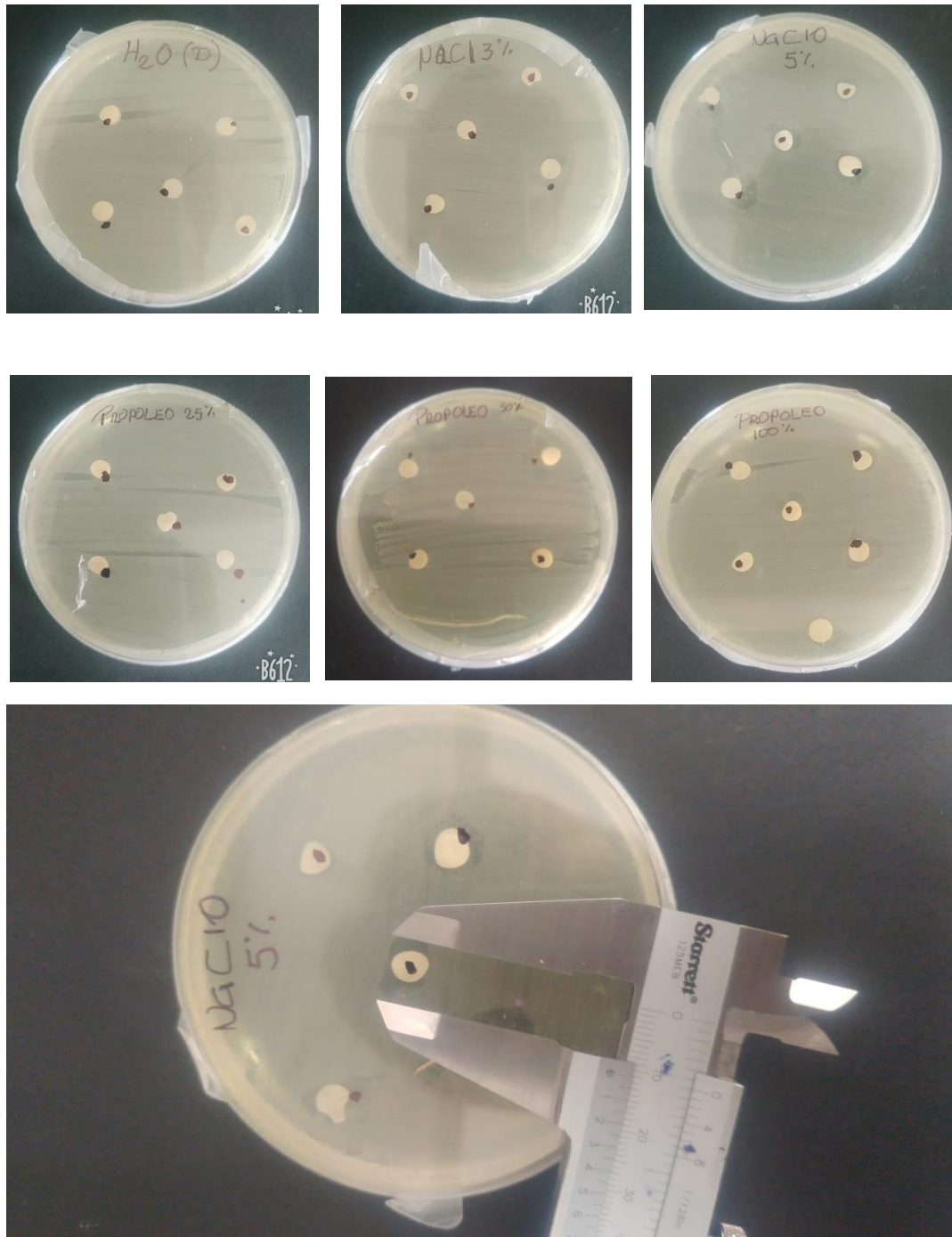


Fig. 3. Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico e hipoclorito de sodio al 5 % y 3 %

Anexo 4

Análisis de Varianza del efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de Propóleo

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	175.498453	2	87.7492267	469.473151	4.03786E-12
Dentro de los grupos	2.24292	12	0.18691		(0,000)
Total	177.741373	14			

Prueba t student para la comparación del Extracto Hidroetanólico de Propóleo y Hipoclorito de sodio 5%

	Variable 1	Variable 2
Media	7.256	10.046
Varianza	0.56073	0.60373
Observaciones	5	5
Varianza agrupada	0.58223	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-5.781318795	
P(T<=t) una cola	0.000206947	
Valor crítico de t (una cola)	1.859548038	
P(T<=t) dos colas	0.000413893	
Valor crítico de t (dos colas)	2.306004135	