



# Universidad Católica de Santa María

**Facultad de Odontología**

**Escuela Profesional de Odontología**

**Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleo  
microencapsulado de la región Arequipa, con potencial efecto  
anticariogénico contra Streptococcus mutans, Arequipa 2025**

Tesis presentada por:

**Peñaranda Peralta, Hector Hugo**

**ORCID: 0009-0003-2368-1865**

para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor:

**Dr. Figueroa Banda, Rufo Alberto**

**ORCID: 0000-0001-7249-0270**

Arequipa – Perú

2026

UCSM-ERP

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**

**ODONTOLOGIA**

**TITULACIÓN CON TESIS**

**DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR**

Arequipa, 28 de Junio del 2026

**Dictamen: 013856-C-EPO-2026**

Visto el borrador del expediente 013856, presentado por:

**2015402261 - PEÑARANDA PERALTA HECTOR HUGO**

Titulado:

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO  
MICROENCAPSULADO DE LA REGIÓN AREQUIPA, CON POTENCIAL EFECTO  
ANTICARIOGÉNICO CONTRA STREPTOCOCCUS MUTANS, AREQUIPA 2025**

Nuestro dictamen es:

**APROBADO**

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

**CIRUJANO DENTISTA**

**04641311 - TEJADA TEJADA RENAN FERNANDO  
DICTAMINADOR**



**29238358 - SALAS ROJAS MONICA HILDA CLEOFE  
DICTAMINADOR**



**29328711 - CARDENAS VILCA TANIA ESTHER  
DICTAMINADOR**



# ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO MICROENCAPSULADO REGIÓN AREQUIPA, CON POTENCIAL EFECTO ANTICARIOGÉNICO CONTRA STREPTOCOCCUS MU AREQUIPA 2025

## INFORME DE ORIGINALIDAD

15%

INDICE DE SIMILITUD

13%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUD

## FUENTES PRIMARIAS

1

Submitted to Universidad Católica de Santa María

Trabajo del estudiante

2

[hdl.handle.net](https://hdl.handle.net)

Fuente de Internet

3

[repositorio.ucsm.edu.pe](https://repositorio.ucsm.edu.pe)

Fuente de Internet

4

[repositorio.uladech.edu.pe](https://repositorio.uladech.edu.pe)

Fuente de Internet

5

[1library.co](https://1library.co)

Fuente de Internet

6

[repositorio.ucv.edu.pe](https://repositorio.ucv.edu.pe)

Fuente de Internet

7

[ri.uaemex.mx](https://ri.uaemex.mx)

Fuente de Internet

8

[alicia.concytec.gob.pe](https://alicia.concytec.gob.pe)

Fuente de Internet

9

[repositorio.uwienner.edu.pe](https://repositorio.uwienner.edu.pe)

Fuente de Internet

10

Submitted to Pontificia Universidad Católica de Chile

Trabajo del estudiante

11

[repositorio.unapiquitos.edu.pe](https://repositorio.unapiquitos.edu.pe)

Fuente de Internet

12

Submitted to Universitat Oberta de Catalunya

Trabajo del estudiante

13

[repositorio.upsjb.edu.pe](https://repositorio.upsjb.edu.pe)

Fuente de Internet

14

[www.revibiomedica.sld.cu](https://www.revibiomedica.sld.cu)

Fuente de Internet

## **DEDICATORIA**

*Dedico esta tesis a Dios padre todopoderoso, por acompañarme a lo largo de estos años, y sobre todo, por guiarme en este proceso tan especial para mi futuro profesional.*

*A mis padres, Victor e Ysabel, que siempre han sido pilares fundamentales en mi vida y en mi proceso profesional, brindandome su apoyo incondicional y amor en todo momento de mi vida.*

*A mis hermanos, Bruno y Anita, por ser fieles compañeros de vida y confidentes a lo largo de toda mi vida y proceso profesional.*

*A mis abuelos, Guillermo y Catalina, por su apoyo incondicional y cariño infinito.*

*A mi mascota, "chatito", por ser un fiel compañero en todo mi proceso universitario.*

*A la Dra. A.R, por su gran apoyo emocional, compañía y motivación durante el proceso de este proyecto y toma de decisiones.*

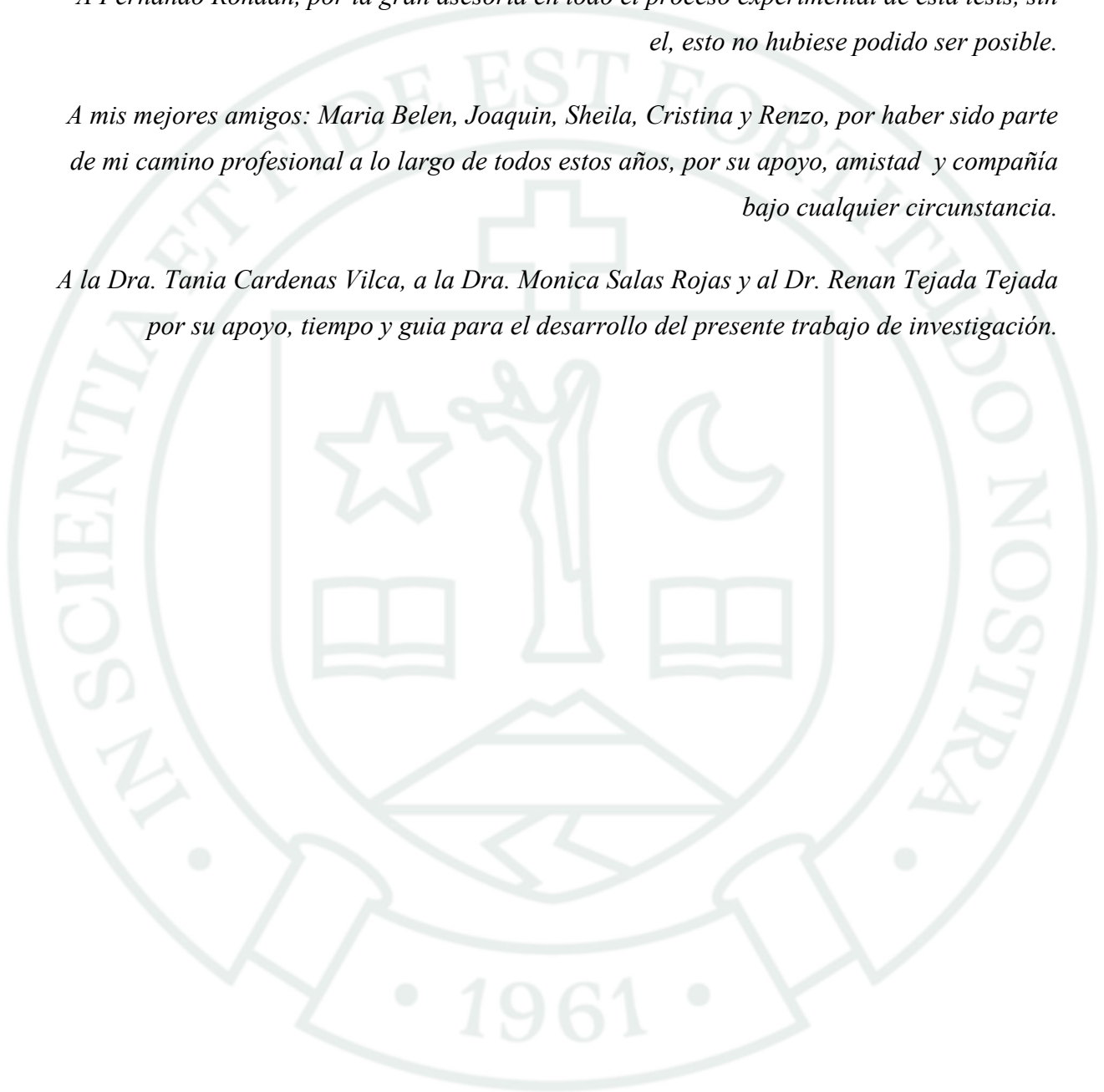
## **AGRADECIMIENTOS**

*Al Dr. Rufo Alberto Figueroa Banda, por brindarme la oportunidad de poder desarrollar este proyecto y por su gran apoyo y asesoría.*

*A Fernando Rondan, por la gran asesoría en todo el proceso experimental de esta tesis, sin el, esto no hubiese podido ser posible.*

*A mis mejores amigos: Maria Belen, Joaquin, Sheila, Cristina y Renzo, por haber sido parte de mi camino profesional a lo largo de todos estos años, por su apoyo, amistad y compañía bajo cualquier circunstancia.*

*A la Dra. Tania Cardenas Vilca, a la Dra. Monica Salas Rojas y al Dr. Renan Tejada Tejada por su apoyo, tiempo y guía para el desarrollo del presente trabajo de investigación.*



## RESUMEN

La caries dental continúa siendo la enfermedad infecciosa más prevalente a nivel mundial, impulsada principalmente por la acción acidogénica del *Streptococcus mutans*. Ante las limitaciones y efectos adversos de los antisépticos sintéticos tradicionales como la clorhexidina, surge la necesidad urgente de validar alternativas terapéuticas naturales que sean bioseguras y sostenibles. En este contexto, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo general evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo de la región Arequipa, procesado mediante tecnología de microencapsulación, frente a cepas certificadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con el propósito de determinar su potencial efecto anticariogénico y su viabilidad como un nuevo vehículo farmacológico.

El estudio fue experimental, in vitro, prospectivo, longitudinal y comparativo, realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica de Santa María. Se trabajó con cultivos bacterianos estandarizados, sometidos a diversas concentraciones de extracto microencapsulado (3%, 6%, 12%, 25% y 50%) con quitosano como matriz. Se utilizó espectrofotometría para medir la densidad óptica (absorbancia) a 500 nm, tras una incubación de 24 horas a 37°C, comparando los resultados con un grupo control sin tratamiento.

Los resultados obtenidos revelaron una relación dosis-dependiente inversa estadísticamente significativa entre la concentración del extracto y el crecimiento bacteriano. El grupo control exhibió una absorbancia media basal de 2.4800 Abs, evidenciando una proliferación bacteriana exponencial. En contraste, las concentraciones experimentales demostraron una reducción progresiva de la turbidez: si bien las dosis bajas del 3% y 6% mostraron un efecto leve, se identificó un punto de quiebre terapéutico a partir del 12% (1.3304 Abs). La mayor eficacia se registró en la concentración del 50%, la cual logró disminuir la absorbancia a un promedio de 0.8033 Abs.

**Palabras clave:** *Propóleo, Streptococcus mutans, anticariogénico.*

## ABSTRACT

*Dental caries continues to be the most prevalent infectious disease worldwide, driven mainly by the acidogenic action of Streptococcus mutans. Given the limitations and adverse effects of traditional synthetic antiseptics such as chlorhexidine, there is an urgent need to validate natural therapeutic alternatives that are biosafe and sustainable. In this context, the general objective of this research work was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract of propolis from the Arequipa region, processed using microencapsulation technology, against certified strains of Streptococcus mutans ATCC 25175, with the purpose of determining its potential anticariogenic effect and its viability as a new pharmacological vehicle.*

*The study was experimental, in vitro, prospective, longitudinal, and comparative, conducted at the Microbiology Laboratory of the Universidad Católica de Santa María. Standardized bacterial cultures were used, subjected to various concentrations of microencapsulated extract (3%, 6%, 12%, 25%, and 50%) with chitosan as the matrix. Spectrophotometry was used to measure optical density (absorbance) at 500 nm, following a 24-hour incubation at 37°C, comparing the results with an untreated control group.*

*The results obtained revealed a statistically significant inverse dose-dependent relationship between the extract concentration and bacterial growth. The control group exhibited a mean basal absorbance of 2.4800 Abs, evidencing exponential bacterial proliferation. In contrast, the experimental concentrations demonstrated a progressive reduction in turbidity: while the low doses of 3% and 6% showed a mild effect, a therapeutic turning point was identified starting at 12% (1.3304 Abs). The highest efficacy was recorded at the 50% concentration, which managed to decrease the absorbance to an average of 0.8033 Abs.*

**Keywords:** *Propolis, Streptococcus mutans, anticariogenic.*

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN ..... 1

PLANTEAMIENTO TEÓRICO..... 3

1.1. Pregunta de investigación..... 4

1.2. Justificación..... 4

1.3. Objetivos ..... 5

1.4. Marco Conceptual y Antecedentes Investigativos ..... 6

1.4.1. Marco Conceptual ..... 6

1.4.2. Antecedentes Investigativos ..... 13

1.5. Hipótesis..... 25

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL ..... 26

2.1. Diseño metodológico..... 27

2.2. Población y muestra ..... 27

2.3. Operacionalización de variables..... 28

2.4. Técnicas y procedimientos ..... 28

2.5. Plan de análisis estadístico ..... 30

2.6. Consideraciones éticas ..... 31

2.7. Recursos ..... 31

RESULTADOS ..... 33

3.1. Resultados ..... 34

3.2. Discusión ..... 42

3.3. Conclusiones ..... 44

3.4. Recomendaciones..... 44



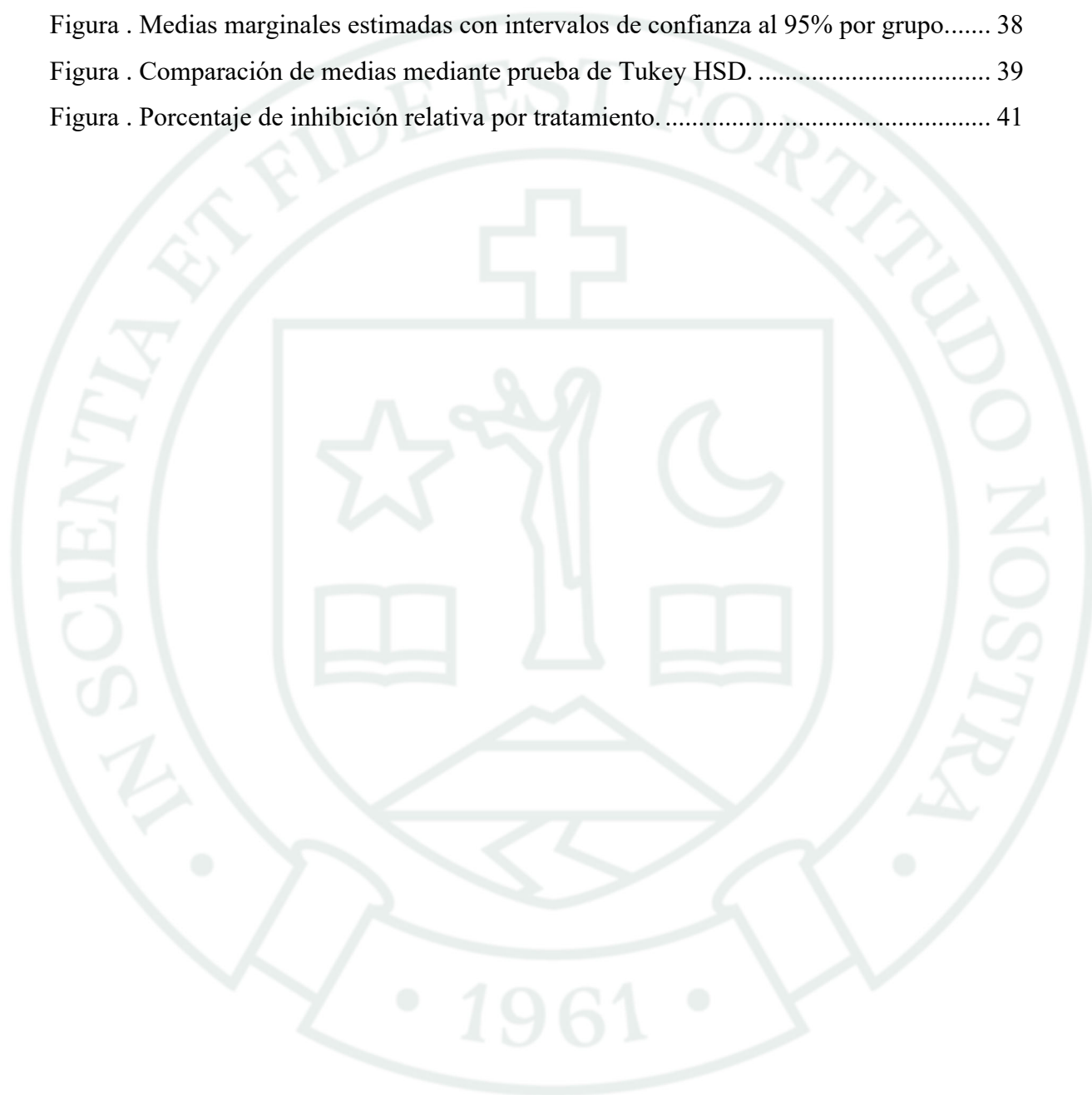
## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla . Diseño metodológico del estudio. ....                                             | 27 |
| Tabla . Operacionalización de variables del estudio. ....                                 | 28 |
| Tabla . Plan de análisis estadístico. ....                                                | 31 |
| Tabla . Datos crudos de absorbancia obtenidos en las tres mediciones por tratamiento..... | 34 |
| Tabla . Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk por grupo. ....             | 35 |
| Tabla . Resultados de la prueba de homocedasticidad de Levene. ....                       | 36 |
| Tabla . ANOVA de un factor para los grupos de tratamiento.....                            | 37 |
| Tabla . Prueba post-hoc de Tukey HSD: comparaciones por pares. ....                       | 39 |
| Tabla . Porcentajes de inhibición relativa respecto al control positivo (CHX 0.12%). .... | 40 |
| Tabla . Ficha de recolección de datos (modelo).....                                       | 50 |



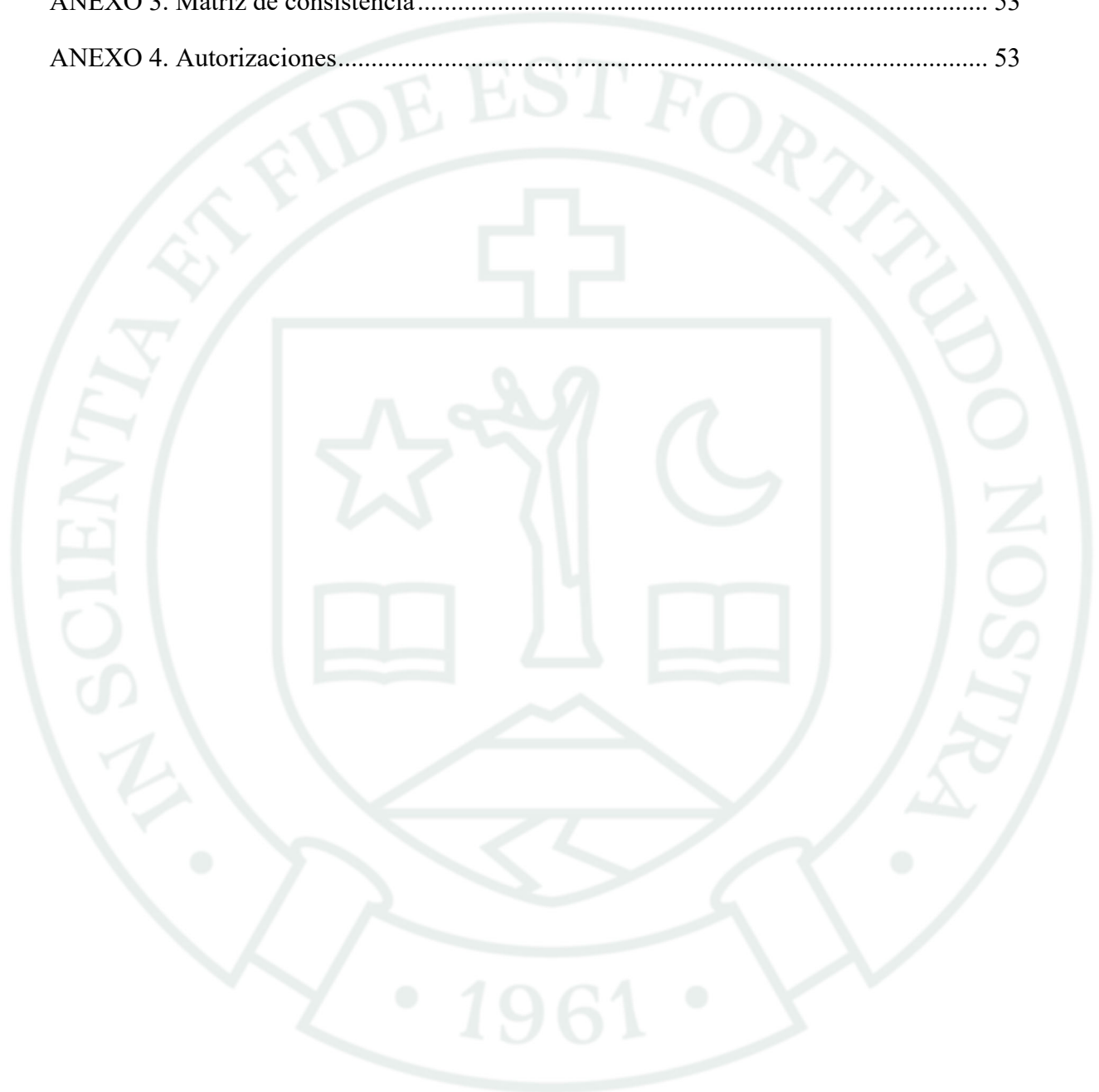
## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura . Efecto de la concentración del propóleo sobre la absorbancia de S. mutans (boxplot).<br>..... | 35 |
| Figura . Visualización gráfica de la homocedasticidad de varianzas entre grupos. ....                  | 37 |
| Figura . Medias marginales estimadas con intervalos de confianza al 95% por grupo.....                 | 38 |
| Figura . Comparación de medias mediante prueba de Tukey HSD. ....                                      | 39 |
| Figura . Porcentaje de inhibición relativa por tratamiento. ....                                       | 41 |



## ÍNDICE DE ANEXOS

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| ANEXO 1. Instrumento – Ficha de recolección de datos .....  | 50 |
| ANEXO 2. Registro fotográfico del trabajo experimental..... | 52 |
| ANEXO 3. Matriz de consistencia.....                        | 53 |
| ANEXO 4. Autorizaciones.....                                | 53 |



# INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales continúan siendo una de las principales preocupaciones de salud pública a nivel mundial. La caries dental, específicamente, afecta a una proporción significativa de la población global, con una prevalencia de aproximadamente 3.5 mil millones de personas que padecen algún tipo de afección dental, según la Organización Mundial de la Salud (OMS). De estas, 2 mil millones de personas presentan caries en dientes permanentes, y 514 millones de niños tienen caries en sus dientes temporales. Esta patología es particularmente prevalente en países de ingresos bajos y medios, donde los factores sociales y económicos influyen considerablemente en el acceso a la salud bucal, así como en la adopción de medidas preventivas y de tratamiento. La caries, al ser una enfermedad crónica y compleja, no solo impacta la salud física de los individuos sino también su calidad de vida, generando dolor, infecciones recurrentes y problemas en las funciones masticatorias y del habla (1).

Además del impacto sanitario, las enfermedades bucales generan costos económicos considerables, tanto para los individuos como para los sistemas de salud pública. El tratamiento de la caries requiere, en muchos casos, intervenciones quirúrgicas, como empastes, endodoncias, y en situaciones más graves, la extracción de dientes, lo que puede generar pérdida de funcionalidad y estética dental. En Perú, un informe del Ministerio de Salud ha revelado que la prevalencia de caries dental en escolares es de aproximadamente 85.6%, siendo la enfermedad más común en niños de 3 a 15 años, lo que refleja la necesidad urgente de estrategias efectivas de prevención y tratamiento en salud bucal (2).

A lo largo de los años, el enfoque para el tratamiento y prevención de la caries ha dependido en gran medida de agentes antimicrobianos y de la higiene oral. El uso de compuestos como la clorhexidina y el fluoruro ha sido ampliamente adoptado en la práctica clínica para combatir la proliferación de las bacterias causantes de la caries. No obstante, el uso prolongado de estos agentes puede conllevar efectos adversos, tales como alteraciones en la microbiota oral y resistencia bacteriana, además de una reducción en la efectividad con el tiempo. En este contexto, la búsqueda de alternativas naturales y menos invasivas se ha intensificado en la comunidad científica. Estas alternativas podrían ofrecer soluciones más seguras y sostenibles para la prevención de la caries dental, sin los efectos secundarios asociados a los antimicrobianos sintéticos (3).

El propóleo, una resina producida por las abejas a partir de exudados vegetales, ha demostrado poseer propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias que lo convierten en un

candidato atractivo para el tratamiento de diversas patologías, incluida la caries dental. Esta sustancia ha sido utilizada tradicionalmente en la medicina popular por sus efectos beneficiosos sobre la salud, y estudios recientes han confirmado su potencial para inhibir el crecimiento de diversas bacterias patógenas, incluyendo *Streptococcus mutans*, una de las principales bacterias involucradas en el desarrollo de la caries dental. La composición química del propóleo varía considerablemente dependiendo de las fuentes vegetales utilizadas por las abejas, lo que puede influir en la potencia y efectividad de sus propiedades terapéuticas. Los principales compuestos activos del propóleo son los flavonoides y los ácidos fenólicos, que han demostrado actividad antimicrobiana contra diversas cepas bacterianas. Estos compuestos no solo inhiben el crecimiento bacteriano, sino que también interfieren en la adhesión de las bacterias a las superficies dentarias, un factor clave en la formación de la caries (4,5).

Aunque diversos estudios han evaluado la actividad antimicrobiana del propóleo, la mayoría se han centrado en extractos provenientes de regiones específicas, como Europa y Brasil. Sin embargo, la variabilidad en la composición del propóleo según la región geográfica y la flora local plantea la necesidad de realizar estudios más específicos en otras zonas. La región de Arequipa, ubicada en el sur de Perú, es conocida por su biodiversidad única, lo que podría influir en la calidad y propiedades del propóleo producido allí. Sin embargo, hasta la fecha, se carece de estudios sistemáticos que evalúen la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleo provenientes de esta región contra *Streptococcus mutans*. Esta brecha en el conocimiento limita la implementación potencial del propóleo local en tratamientos odontológicos preventivos o terapéuticos (6).

El propósito principal de esta investigación es evaluar la eficacia del propóleo de Arequipa como agente anticariogénico natural, comparando su actividad antimicrobiana con tratamientos convencionales como la clorhexidina. A través de ensayos microbiológicos *in vitro*, se determinará la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bacteriostática (CMB) y el halo de inhibición de diferentes concentraciones de propóleo microencapsulado. Estos resultados permitirán evaluar el potencial del propóleo microencapsulado como un tratamiento efectivo para la caries dental, en línea con las tendencias actuales que buscan alternativas naturales en la medicina dental (3,7).



**CAPÍTULO I**  
**PLANTEAMIENTO TEÓRICO**

## **1.1. Pregunta de investigación**

Pregunta principal:

¿El extracto etanólico de propóleo microencapsulado de la región Arequipa presenta una actividad antimicrobiana significativa contra *Streptococcus mutans*, demostrando un potencial efecto anticariogénico?

Preguntas secundarias:

¿Cómo varía la efectividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo microencapsulado frente a *Streptococcus mutans* en función de su concentración (0.5%, 1%, 2%)?

¿Cuál es la comparación de la actividad antimicrobiana del propóleo microencapsulado frente a *Streptococcus mutans* en comparación con el agente antimicrobiano convencional, como la clorhexidina?

## **1.2. Justificación**

### **Justificación económica:**

El propóleo es un recurso natural accesible y económico, especialmente en regiones con una fuerte tradición apícola como Arequipa. Su producción no requiere grandes inversiones, ya que se obtiene de las colmenas de abejas, lo que permite aprovechar un recurso local de bajo costo. Además, el uso del propóleo en la industria odontológica puede reducir los costos asociados con los tratamientos convencionales para la caries dental, que en muchos casos requieren procedimientos más invasivos y costosos como empastes, endodoncias y extracciones dentales. En este sentido, el desarrollo de productos dentales basados en propóleo microencapsulado podría proporcionar una alternativa económica tanto para los pacientes como para los sistemas de salud pública, favoreciendo la adopción de métodos preventivos y terapéuticos más asequibles y sostenibles. Además, la promoción de la apicultura local contribuiría al fortalecimiento de la economía regional, alineándose con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) relacionados con el trabajo decente y el crecimiento económico (ODS 8), impulsando tanto la producción como la innovación en la industria apícola (8).

### **Justificación de salud:**

Desde el punto de vista de la salud, el propóleo ofrece una alternativa natural y segura frente a los tratamientos antimicrobianos convencionales, los cuales, si bien efectivos, conllevan riesgos

asociados como la alteración de la microbiota oral y la resistencia bacteriana. El propóleo, debido a su compleja composición química, presenta propiedades antimicrobianas sin generar los efectos secundarios negativos típicos de los antibióticos sintéticos. La investigación sobre su uso en odontología es crucial, ya que podría ofrecer una solución efectiva para la prevención de la caries dental, una de las enfermedades más comunes en la población mundial, especialmente en niños y adolescentes. Además, su uso en productos de cuidado bucal como enjuagues y pastas dentales permitiría una intervención menos invasiva, ayudando a reducir la dependencia de los antibióticos, lo cual está en línea con la tendencia creciente hacia la medicina preventiva y el cuidado bucal natural. Al integrarse en los tratamientos de salud dental, el propóleo no solo contribuiría a la reducción de enfermedades bucales, sino también a mejorar la calidad de vida de los pacientes, con menos riesgos de efectos adversos asociados a tratamientos convencionales (9).

#### **Justificación científica:**

Desde una perspectiva científica, este estudio llena un vacío importante en la literatura sobre el propóleo, específicamente en relación con su actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, el principal patógeno involucrado en la caries dental. Si bien existen estudios previos sobre las propiedades antimicrobianas del propóleo, la mayoría se centran en regiones específicas y en diferentes métodos de extracción. La investigación de propóleo proveniente de Arequipa es innovadora, ya que esta región tiene una flora única que puede conferir características particulares a la resina utilizada por las abejas. Además, la microencapsulación del propóleo representa una mejora tecnológica significativa, ya que permite mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos y su liberación controlada en el sitio de acción. El estudio no solo tiene el potencial de contribuir al desarrollo de nuevos productos terapéuticos, sino también de abrir nuevas líneas de investigación sobre el uso de productos naturales en la medicina odontológica, complementando y, en algunos casos, sustituyendo las terapias convencionales. Este avance científico podría tener un impacto duradero en el campo de la microbiología oral, promoviendo una mayor comprensión de las propiedades del propóleo y su posible aplicación como tratamiento preventivo y curativo (10).

### **1.3. Objetivos**

#### **Objetivo general:**

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo microencapsulado de la región Arequipa frente a *Streptococcus mutans*, para determinar su potencial efecto

anticariogénico y su viabilidad como alternativa natural en el tratamiento y prevención de la caries dental.

### **Objetivos específicos:**

Determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo microencapsulado en diferentes concentraciones (0.5%, 1% y 2%) mediante ensayos de inhibición del crecimiento bacteriano, como la medición de los halos de inhibición y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bacteriostática (CMB) contra *Streptococcus mutans*.

Comparar la efectividad antimicrobiana del propóleo microencapsulado en diferentes concentraciones con tratamientos convencionales como la clorhexidina al 0.12%, para evaluar su potencial como un agente anticariogénico natural y su viabilidad frente a los antimicrobianos sintéticos utilizados en odontología.

## **1.4. Marco Conceptual y Antecedentes Investigativos**

### **1.4.1. Marco Conceptual**

#### **La Caries Dental**

La caries dental se conceptualiza no solo como una enfermedad aislada, sino como un problema alarmante de salud pública a nivel mundial que trasciende barreras socioeconómicas y etarias. Se define como una patología multifactorial que provoca la destrucción de los tejidos duros del diente a través de la producción de ácidos derivados de la fermentación bacteriana de carbohidratos (11).

#### **Cifras de Prevalencia Mundial**

Las estadísticas actuales son críticas para comprender la magnitud del problema. Según los últimos reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que aproximadamente 2,300 millones de personas padecen caries en sus dientes permanentes. Adicionalmente, el impacto en la población infantil es devastador, con cerca de 514 millones de niños sufriendo de caries en la dentición decidua (dientes de leche). Estas cifras, que suman cerca de 3,500 millones de personas afectadas por enfermedades bucodentales en total, revelan que casi la mitad de la población mundial sufre las consecuencias de estas patologías, concentrándose tres de cada cuatro casos en países de ingresos medios (12).

## **Situación Epidemiológica en el Perú**

En el contexto nacional peruano, la situación refleja una crisis de salud pública severa. La prevalencia de caries en la población escolar de entre 3 y 15 años alcanza un alarmante 85.6%, lo que implica que 9 de cada 10 escolares sufren de esta enfermedad. Los datos del Ministerio de Salud (Minsa) indican además que el índice CPOd (dientes cariados, perdidos y obturados) en niños de hasta 12 años es de aproximadamente 4 piezas dentales afectadas. El impacto va más allá de la estructura dental; la maloclusión molar afecta al 52.2% de los escolares de 6 a 15 años, y la enfermedad periodontal alcanza al 52.5% en el grupo de 10 a 15 años. Estas condiciones generan repercusiones directas en la calidad de vida, causando dolor, infecciones y limitaciones funcionales en la alimentación y el habla (13).

### **Agente Etiológico: Streptococcus mutans**

Dentro de la compleja microbiota oral, el Streptococcus mutans es identificado como el microorganismo cariígeno por excelencia. Su presencia es ubicua, aislándose en el 70% al 90% de la población, incluso en aquellos individuos considerados resistentes a la caries (14).

### **Factores de Virulencia y Cariogenicidad**

La patogenicidad del S. mutans reside en su capacidad para colonizar superficies duras y formar biopelículas. Sus mecanismos de virulencia incluyen:

**Síntesis de Polisacáridos Extracelulares (PEC):** A través de enzimas glucosiltransferasas (GTF-I, GTF-S), el S. mutans sintetiza glucanos insolubles y solubles que facilitan la adhesión bacteriana y la cohesión de la placa dental (15).

**Acidogenicidad y Acidurocidad:** Posee un alto poder acidógeno (producción de ácidos) y es acidúrico, lo que le permite iniciar su crecimiento a un pH de 5, un entorno hostil para muchas otras bacterias, manteniendo un efecto metabólico activo incluso en condiciones ácidas.

**Adhesión:** Su capacidad adhesiva es mediada por proteínas parietales que permiten la fijación a superficies dentales incluso en ausencia de glucanos.

### **Mecanismos de resistencia bacteriana y la respuesta del propóleo**

La problemática de la resistencia bacteriana en odontología, particularmente en cepas de Streptococcus mutans, se ha intensificado debido a la capacidad adaptativa de este microorganismo para sobrevivir en entornos hostiles, desarrollando mecanismos sofisticados como la alteración de la permeabilidad de su membrana externa y la producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar agentes antimicrobianos convencionales. Esta resistencia se ve

favorecida por la formación de biopelículas complejas, donde las bacterias se incrustan en una matriz de polisacáridos extracelulares que actúa como barrera física contra los antibióticos, permitiendo que poblaciones bacterianas persistan incluso tras tratamientos agresivos. En este escenario crítico, el propóleo emerge como un agente terapéutico superior debido a su "complejidad química", la cual incluye una combinación sinérgica de más de 300 compuestos identificados, entre flavonoides, ácidos fenólicos y terpenos, que atacan múltiples dianas moleculares simultáneamente, dificultando extremadamente que la bacteria desarrolle una resistencia genética específica contra todos los componentes a la vez (20,21).

La acción del propóleo sobre cepas resistentes se fundamenta en su capacidad para desestabilizar la fuerza motriz de protones de la membrana bacteriana, un proceso bioenergético esencial para la supervivencia celular, inducido principalmente por compuestos como la quercetina y la naringenina que incrementan la permeabilidad de la membrana y provocan la fuga de electrolitos vitales como el potasio, llevando a la lisis osmótica de la bacteria. Además, estudios moleculares han demostrado que ciertos componentes del propóleo, como el éster fenílico del ácido cafeico (CAPE), inhiben directamente la actividad de la glucosiltransferasa, la enzima responsable de la síntesis de glucanos insolubles que permiten la adhesión de *S. mutans* al esmalte dental (22). Esta inhibición enzimática no solo previene la formación de nueva placa dental, sino que debilita la estructura de las biopelículas ya establecidas, permitiendo que otros componentes bioactivos penetren en las capas profundas de la colonia bacteriana y ejerzan su efecto bactericida, un mecanismo de acción dual que es difícil de replicar con antimicrobianos sintéticos monomoleculares.

### **Impacto de la Variabilidad Geográfica en el Propóleo de Arequipa**

La composición química del propóleo no es estática, sino que es un reflejo directo de la biodiversidad botánica de la región de recolección, en este caso Arequipa, donde las condiciones climáticas y la flora endémica confieren al propóleo local un perfil fitoquímico único que podría potenciar su actividad biológica. A diferencia de los propóleos de regiones tropicales que son ricos en derivados prenilados, el propóleo de zonas templadas y de altura como Arequipa suele caracterizarse por una alta concentración de flavonoides tipo pinocembrina, galangina y crisina, así como ácidos fenólicos como el ácido cafeico y ferúlico, compuestos que han demostrado tener una correlación directa con la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas. Esta variabilidad geoquímica implica que los resultados obtenidos en estudios europeos o asiáticos no son directamente extrapolables, haciendo imperativo el estudio local para validar la eficacia terapéutica del recurso nativo. El factor

geográfico influye también en las propiedades físicas del extracto, como su solubilidad y estabilidad, variables que son críticas al momento de diseñar formas farmacéuticas como las microcápsulas de alginato. Estudios comparativos han evidenciado que propóleos recolectados en diferentes altitudes y épocas del año presentan variaciones significativas en el contenido de polifenoles totales, lo que a su vez afecta la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) requerida para detener el crecimiento de patógenos orales. Por tanto, la estandarización del propóleo arequipeño mediante técnicas cromatográficas y la posterior evaluación de su actividad biológica específica contra cepas locales de *Streptococcus mutans* no solo valida su uso tradicional, sino que añade valor a la cadena productiva apícola regional, alineándose con objetivos de desarrollo económico sostenible al transformar una materia prima bruta en un insumo biotecnológico de alto valor agregado para la industria odontológica (22).

### **Farmacodinamia molecular de los flavonoides**

Para comprender la magnitud del potencial terapéutico del propóleo, es imperativo descender al nivel molecular y definir los mecanismos farmacodinámicos específicos mediante los cuales sus metabolitos secundarios interactúan con las estructuras bacterianas, superando la simple noción de "actividad antibacteriana" general. La literatura científica referenciada en este estudio destaca que compuestos específicos como la quercetina, la apigenina y la pentahidroxi flavona no actúan de manera inespecífica, sino que tienen como diana molecular la inhibición de la ADN girasa bacteriana, una enzima topoisomerasa esencial para la replicación, transcripción y reparación del material genético en procariotas. Al bloquear esta enzima en microorganismos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, estos flavonoides inducen la detención del ciclo celular y la eventual muerte bacteriana, un mecanismo que difiere de los antibióticos betalactámicos tradicionales y que, por ende, ofrece una vía alternativa para combatir cepas resistentes. Adicionalmente, se ha documentado un mecanismo de toxicidad de membrana mediado por la galangina, un flavonoide predominante en el propóleo, el cual provoca un fenómeno de "lisis osmótica" al inducir la pérdida masiva de electrolitos intracelulares críticos. Estudios citados en el trabajo cuantifican este efecto, reportando incrementos en la concentración de potasio extracelular (indicativo de fuga citoplasmática) del orden del 15.11% para muestras de propóleo de Huaral y hasta un 16.39% para muestras de Ayacucho (24). Esta desestabilización de la membrana citoplasmática no solo compromete la integridad estructural de la bacteria, sino que disipa el potencial electroquímico o fuerza motriz de protones necesaria para la síntesis de ATP, llevando al colapso energético del microorganismo, un efecto que se

ve potenciado por la acción sinérgica con otros ácidos fenólicos como el ácido p-cumárico, el cual también incrementa la permeabilidad de la membrana e inhibe la síntesis de ADN.

### **Bioquímica de la patogenicidad cariogénica**

La definición conceptual de la caries dental en este estudio se centra en la actividad metabólica del agente etiológico, *Streptococcus mutans*, cuya virulencia depende intrínsecamente de su capacidad para sintetizar polisacáridos extracelulares (PEC) a partir de la sacarosa dietética. Este proceso es catalizado por un complejo enzimático de glucosiltransferasas (GTF), clasificadas específicamente en la tesis como GTF-I (que produce glucanos insolubles en agua), GTF-S (que produce glucanos solubles) y FTF (fructosiltransferasa). La distinción conceptual entre estos tipos de polisacáridos es crucial: los glucanos insolubles actúan como el "cemento" biológico que permite la adhesión firme de la bacteria a la superficie lisa del esmalte dental y favorece la cohesión entre bacterias para formar la biopelícula o placa dental, creando un microambiente protegido donde la bacteria puede proliferar y metabolizar carbohidratos. Dentro de esta matriz de biopelícula, la capacidad acidogénica y acidúrica del *S. mutans* cobra relevancia patológica, definiéndose como la habilidad no solo de producir ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico) que descenden el pH del medio, sino de mantener su metabolismo activo y crecimiento incluso cuando el pH alcanza niveles críticos de 5.0. Este entorno ácido sostenido es el responsable directo de la desmineralización de los cristales de hidroxiapatita del esmalte. El marco conceptual subraya que la inhibición de estas enzimas GTF por parte de los compuestos del propóleo (como el éster fenético del ácido cafeico y la apigenina) representa una estrategia preventiva más eficaz que la simple acción bactericida, ya que ataca el mecanismo de virulencia (la formación de placa) antes de que se establezca la enfermedad, interfiriendo con la colonización inicial en el 70% al 90% de la población que actúa como portadora del patógeno (25).

### **Fundamentos fisicoquímicos de la matriz polimérica de alginato**

En el contexto de la ingeniería de tejidos y la farmacología, la matriz utilizada para la microencapsulación se define conceptualmente como un sistema de liberación controlada basado en polímeros naturales. En esta tesis, se selecciona el alginato de sodio, un polisacárido aniónico lineal obtenido de algas pardas, debido a su capacidad única para formar hidrogeles estables en presencia de cationes divalentes como el Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). El proceso de "gelificación iónica" descrito implica la interacción electrostática entre los bloques de ácido gulurónico del alginato y los iones de calcio de la solución reticulante al 0.1 M, formando una estructura conformacional conocida teóricamente como "caja de huevos" (egg-box model) (25).

La definición de los parámetros de síntesis es crítica para la funcionalidad del producto final: la concentración del polímero al 2% (p/v) determina la viscosidad de la solución y, por ende, el tamaño y la esfericidad de las microcápsulas formadas al gotearse a través de una aguja calibre 22G desde una distancia de 10 cm. Asimismo, el tiempo de curado o reticulación, establecido rigurosamente en 30 minutos, define la densidad de la red polimérica; un tiempo menor resultaría en cápsulas frágiles con liberación explosiva (burst effect), mientras que un tiempo excesivo podría endurecer demasiado la matriz, impidiendo la liberación terapéutica. Finalmente, el proceso de secado a 37°C durante 24 horas se conceptualiza como una etapa de estabilización que elimina el agua libre sin degradar los fenoles termolábiles, resultando en un sistema de entrega de fármacos sólido y manejable para su incorporación en pastas o enjuagues (25).

### **Estandarización Microbiológica**

Para garantizar la validez científica y la reproducibilidad de los resultados experimentales en microbiología, es fundamental definir el concepto de "estandarización del inóculo". En este estudio, la carga bacteriana utilizada para desafiar a los extractos de propóleo no es aleatoria, sino que se ajusta rigurosamente utilizando la Escala de McFarland, un patrón de turbidez fisicoquímico que relaciona la densidad óptica de una suspensión bacteriana con el número aproximado de bacterias presentes. Específicamente, se emplea el estándar de 0.5 McFarland, el cual equivale teóricamente a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL, aunque para los ensayos de microdilución se ajusta finalmente a una concentración de trabajo aproximada de  $5 \times 10^5$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro) en cada pocillo. Esta estandarización es un concepto crítico que permite comparar la potencia del propóleo frente a la clorhexidina de manera objetiva. Si la turbidez del inóculo fuera menor a 0.5, se podría sobreestimar la eficacia del propóleo (falsos sensibles); si fuera mayor, se podría subestimar (falsos resistentes). La tesis enfatiza que este ajuste debe realizarse mediante espectrofotometría o comparación visual directa contra estándares de sulfato de bario, asegurando que todas las réplicas experimentales partan de la misma presión biológica. Este rigor metodológico transforma la observación empírica de un "halo de inhibición" en un dato cuantitativo válido (medido en milímetros con vernier de precisión), permitiendo clasificar al *S. mutans* como susceptible, intermedio o resistente según los puntos de corte establecidos por normativas internacionales como las del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (20,25,26).

## **Contexto Socioeconómico y Sostenibilidad.**

Finalmente, el marco conceptual de esta investigación trasciende el laboratorio para integrarse en un contexto de desarrollo global, definiendo su relevancia a través de la alineación con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de las Naciones Unidas. Se conceptualiza la producción de propóleo microencapsulado no solo como una innovación farmacéutica, sino como una intervención directa en el ODS 3: Salud y Bienestar, al proponer una solución accesible y de bajo costo para una patología que afecta al 85.6% de los escolares peruanos y a 3,500 millones de personas a nivel mundial. La validación científica de un recurso natural reduce la dependencia de fármacos sintéticos importados y mitiga los efectos secundarios asociados a su uso crónico, democratizando el acceso a la salud bucal preventiva. Simultáneamente, el proyecto se enmarca conceptualmente en el ODS 8: Trabajo Decente y Crecimiento Económico. Al valorizar el propóleo de la región Arequipa mediante su caracterización química y transformación tecnológica, se promueve la cadena productiva apícola local. Esto implica que la apicultura deja de ser vista únicamente como una actividad artesanal de producción de miel, para redefinirse como una fuente de insumos biotecnológicos de alto valor agregado. Este enfoque de "bioeconomía" sugiere que la investigación científica puede actuar como un motor de desarrollo regional, incentivando a los productores locales a mejorar sus estándares de calidad y recolección, sabiendo que su producto tiene una aplicación validada en la industria odontológica, cerrando así el ciclo entre la ciencia básica, la aplicación clínica y el desarrollo social (27).

## **Síntesis Teórica y Formulación de la Hipótesis**

La integración de los conceptos expuestos conforma un marco teórico robusto que justifica la intervención experimental propuesta: la microencapsulación de extractos etanólicos de propóleo arequipeño como estrategia para superar las limitaciones de estabilidad y sabor de los extractos crudos, manteniendo intacta su potente actividad antimicrobiana. La evidencia científica revisada sugiere que la matriz polimérica de alginato de sodio no interfiere con la liberación de los flavonoides, sino que actúa como un vehículo de liberación controlada que podría prolongar el tiempo de contacto del agente activo con la superficie dental, mejorando así la eficacia clínica en comparación con los enjuagues convencionales que son rápidamente eliminados por el flujo salival. Este enfoque tecnológico responde directamente a la necesidad de nuevas terapias preventivas ante la prevalencia masiva de caries dental, que afecta a más del 85% de la población escolar en la región (23).

En base a este razonamiento deductivo y a los antecedentes empíricos que demuestran la sensibilidad de *S. mutans* a los compuestos fenólicos, se formula la hipótesis de investigación que guía este estudio: "Es probable que el extracto etanólico de propóleo de la región Arequipa, al ser procesado mediante la técnica de microencapsulación por gelificación iónica, conserve y potencie su actividad antimicrobiana frente a cepas de *Streptococcus mutans*, mostrando una eficacia inhibitoria comparable o complementaria a la de la clorhexidina al 0.12%, pero con un perfil de bioseguridad superior". Esta hipótesis se contrastará mediante la medición rigurosa de halos de inhibición y la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria en un diseño experimental controlado in vitro, cuyos resultados pretenden sentar las bases para el desarrollo de una nueva generación de productos anticariogénicos de origen natural y producción nacional (23).

#### **1.4.2. Antecedentes Investigativos**

En esta sección se presentan los antecedentes investigativos relevantes, organizados en tres niveles: internacionales (estudios publicados fuera del Perú), nacionales (estudios desarrollados en otras regiones del Perú) y locales (estudios realizados en la región Arequipa o con propóleo arequipeño). Cada antecedente se reporta con su título, autores, fuente, resumen, resultados principales y conclusión.

##### **A) Antecedentes internacionales**

Los siguientes estudios fueron desarrollados fuera del Perú y aportan evidencia sobre la actividad antimicrobiana del propóleo y sobre tecnologías de microencapsulación aplicadas al control de *Streptococcus mutans*.

**Título:** *Actividad antibacteriana de un extracto etanólico de propóleo peruano frente a Streptococcus mutans.*

**Autores:** Checalla Collatupa, Jackeline Luciana; Sánchez-Tito, Marco Antonio.

**Fuente:** Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas. 2021; 40(3): e1121. Disponible en Scielo.

**Resumen:** Esta investigación de carácter experimental in vitro tuvo como propósito principal evaluar la eficacia antimicrobiana del propóleo de origen peruano, específicamente de la región de Oxapampa, frente a la cepa estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, reconociendo la necesidad de validar científicamente los recursos naturales nacionales. Para la obtención del principio activo, los autores aplicaron un protocolo de maceración en alcohol etílico al 70% durante un periodo de 15 días, logrando un extracto etanólico base que posteriormente fue

diluido en agua destilada para obtener concentraciones experimentales del 25%, 50% y 75%. El diseño metodológico empleó la prueba de difusión en disco (Kirby-Bauer) sobre placas de agar cerebro-corazón, un medio enriquecido que favorece el crecimiento de bacterias exigentes. Se establecieron grupos de control rigurosos, utilizando clorhexidina al 0.12% como control positivo (estándar de oro) y agua destilada como control negativo, incubando las muestras a 37°C por 48 horas bajo condiciones de microaerofilia para simular el ambiente oral.

**Resultados:** El análisis morfométrico de los halos de inhibición reveló que el extracto etanólico de propóleo posee una actividad antibacteriana constante en todas las concentraciones evaluadas, aunque con diferencias cuantitativas respecto al control sintético. Específicamente, la concentración al 25% generó un halo promedio de  $17.58 \pm 2.57$  mm, la de 50% un halo de  $16.90 \pm 1.89$  mm y la de 75% un halo de  $16.88 \pm 2.01$  mm. Si bien estos valores demostraron una clara acción inhibitoria, fueron estadísticamente inferiores ( $p < 0.05$ ) al promedio alcanzado por la clorhexidina al 0.12%, que registró  $24.54 \pm 2.48$  mm. No obstante, según la escala de sensibilidad de Duraffourd aplicada en el estudio, la bacteria fue clasificada como "sensible" y "muy sensible" frente al propóleo, lo que indica que, a pesar de tener una potencia in vitro menor al fármaco de referencia, el producto natural mantiene una capacidad biológica suficiente para interrumpir el desarrollo bacteriano (28).

**Conclusión:** Los investigadores concluyen que el propóleo peruano constituye una fuente promisoría de agentes antimicrobianos, demostrando una efectividad significativa contra el principal patógeno de la caries dental. A pesar de que la clorhexidina mostró una potencia superior en términos de diámetro de inhibición, el estudio resalta que el propóleo ofrece ventajas competitivas como su baja toxicidad y menor propensión a generar resistencia bacteriana. Se sugiere que la actividad observada se debe a la sinergia de sus metabolitos secundarios, principalmente flavonoides y terpenos, validando su uso potencial como coadyuvante en la higiene oral, aunque se recomienda estandarizar los procesos de extracción para maximizar su concentración de fenoles y alcanzar eficacias equiparables a los antisépticos sintéticos (28).

**Título:** *Antibacterial Effect of Peruvian Propolis Collected During Different Seasons on the Growth of Streptococcus mutans (Efecto antibacteriano del propóleo peruano recolectado durante diferentes estaciones sobre el crecimiento de Streptococcus mutans).*

**Autores:** Becerra, T.; Calla-Poma, R.; Requena-Mendizabal, M.; Millones-Gómez, P.

**Fuente:** The Open Dentistry Journal. 2019; 13: 327-331. DOI: 10.2174/1874210601913010327.

**Resumen:** Este estudio abordó una variable crítica y a menudo ignorada en la fitoterapia: la influencia de la estacionalidad en la composición química y actividad biológica del propóleo. El objetivo fue comparar la capacidad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleo recolectados en dos estaciones distintas (verano y otoño) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La hipótesis de trabajo planteaba que las condiciones climáticas y la floración disponible en cada época del año alteran el perfil de flavonoides del producto apícola. Metodológicamente, se prepararon extractos al 5% a partir de muestras recolectadas en la región andina del Perú, y se evaluó su actividad mediante la técnica de difusión en pozo en agar. El estudio es relevante porque introduce el concepto de "variabilidad geo-climática" como un factor determinante para la estandarización de productos farmacéuticos basados en propóleo, buscando establecer cuál es el momento óptimo de recolección para garantizar la máxima potencia terapéutica.

**Resultados:** Los hallazgos fueron contundentes al demostrar una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) dependiente de la estación de recolección. El extracto de propóleo obtenido durante la estación de otoño generó halos de inhibición con un diámetro promedio de  $26.4 \pm 2.6$  mm, superando notablemente al extracto recolectado en verano, que alcanzó un promedio de  $18.2 \pm 1.8$  mm. Sorprendentemente, el propóleo de otoño mostró en este ensayo una actividad superior incluso al control positivo de clorhexidina utilizado en algunas réplicas (que rondó los 13-20 mm en este diseño específico), sugiriendo que el estrés ambiental o los cambios fenológicos de las plantas en otoño inducen a las abejas a recolectar resinas con mayor concentración de compuestos defensivos. Ambos extractos fueron superiores al control negativo de etanol, confirmando que la actividad no se debía al solvente.

**Conclusión:** Los autores concluyen que la estacionalidad es un factor de calidad crítico que no debe subestimarse en la industria farmacéutica del propóleo. Se determina que el propóleo de otoño posee un perfil antibacteriano superior frente a *S. mutans*, probablemente debido a una mayor concentración de ácidos fenólicos y flavonoides específicos sintetizados por la flora local en respuesta a los cambios climáticos de esa temporada. Este hallazgo tiene implicancias directas para la manufactura de productos odontológicos, sugiriendo que para obtener formulaciones con alta eficacia anticariogénica, se debe priorizar el uso de materia prima recolectada en meses específicos, o bien realizar ajustes de concentración basados en la cuantificación de polifenoles lote por lote para asegurar una dosificación terapéutica homogénea (29).

**Título:** *Development, Physicochemical Properties, and Antibacterial Activity of Propolis Microcapsules (Desarrollo, propiedades fisicoquímicas y actividad antibacteriana de microcápsulas de propóleo).*

**Autores:** Wang, L.; Li, Y.; Lin, L.; Li, B.; Feng, Z.

**Fuente:** Foods. 2023; 12(17): 3191. DOI: 10.3390/foods12173191.

**Resumen:** Esta investigación internacional reciente aborda la problemática de la inestabilidad y el fuerte sabor del propóleo crudo mediante la implementación de tecnología de microencapsulación, un enfoque directamente relacionado con la variable independiente de la presente tesis. El objetivo principal fue desarrollar microcápsulas utilizando una mezcla de goma arábiga y  $\beta$ -ciclodextrina como materiales de pared mediante la técnica de secado por aspersión (spray-drying), para posteriormente evaluar su morfología, eficiencia de encapsulación y, crucialmente, su actividad antibacteriana sostenida frente a patógenos como el *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, sirviendo como modelo de liberación controlada aplicable a bacterias orales. La metodología incluyó una caracterización exhaustiva mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para verificar la esfericidad, espectroscopia infrarroja (FTIR) para confirmar la incorporación química sin degradación de los polifenoles, y ensayos de liberación in vitro para determinar la cinética de disolución del principio activo encapsulado en comparación con el extracto etanólico libre, buscando validar si la matriz polimérica protege la bioactividad del propóleo en el tiempo.

**Resultados:** Los resultados fisicoquímicos demostraron una eficiencia de encapsulación superior al 90.99%, con un tamaño de partícula promedio de 445.66 nm, lo que indica un proceso de manufactura altamente eficiente capaz de retener la casi totalidad de los compuestos bioactivos. En cuanto a la actividad microbiológica, se observó un fenómeno de gran relevancia clínica: si bien las microcápsulas mostraron una actividad antibacteriana inmediata ligeramente inferior a la del propóleo libre (debido a la barrera física que supone la pared de la cápsula), lograron una liberación sostenida del principio activo durante un periodo de 8 días. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para las bacterias testadas se estableció en rangos de 0.15 a 1.25 mg/mL. Este hallazgo es fundamental pues sugiere que, aunque el "golpe" inicial bactericida puede ser menor, la microencapsulación garantiza una presencia terapéutica prolongada en el sitio de acción, algo que los enjuagues convencionales no logran debido al lavado salival inmediato.

**Conclusión:** Los autores concluyen que la microencapsulación no solo mejora la estabilidad física y las características organolépticas del propóleo, haciéndolo más aceptable para el

consumo humano, sino que transforma su farmacocinética hacia un sistema de liberación controlada. Se determina que estas microcápsulas poseen un potencial enorme para ser incorporadas en alimentos funcionales o productos farmacéuticos donde se requiera una asepsia prolongada. Para la presente tesis, este antecedente valida teóricamente el uso de polímeros (como el alginato o la goma arábica) para crear vehículos que mantengan la actividad antibiofilm del propóleo por más tiempo en la cavidad oral, superando la limitación de la corta vida media de los colutorios tradicionales (20).

**Título:** *Antimicrobial Activity of Propolis against Streptococcus mutans Compare with Chlorhexidine (Actividad antimicrobiana del propóleo contra Streptococcus mutans comparada con clorhexidina).*

**Autores:** Preethi, G.; Murali Dharan, N. P.

**Fuente:** Journal of Pharmaceutical Research International. 2021; 33(63B): 374-380. DOI: 10.9734/jpri/2021/v33i63B35667.

**Resumen:** Este estudio experimental in vitro tuvo como objetivo central realizar una comparación directa de eficacia ("Head-to-Head") entre el extracto de propóleo y el "Gold Standard" odontológico, el digluconato de clorhexidina al 0.2%, frente al principal agente causal de la caries dental. La justificación del estudio radica en la necesidad de encontrar alternativas orgánicas que no presenten los efectos secundarios de manchas y alteraciones del gusto asociados al uso crónico de la clorhexidina. La metodología empleó dos técnicas complementarias para asegurar la robustez de los datos: el método de difusión en disco para visualizar los halos de inhibición y el método de dilución en caldo para cuantificar la reducción de la viabilidad bacteriana. Se prepararon diluciones seriadas de propóleo (1g, 1.25g, 1.5g) en etanol y se expusieron a cultivos estandarizados de *Streptococcus mutans* durante 24 horas, evaluando posteriormente la supervivencia bacteriana mediante recuento de colonias y turbidimetría.

**Resultados:** Los hallazgos experimentales revelaron una eficacia sorprendente del producto natural. Tras 24 horas de exposición, las muestras tratadas con las concentraciones más altas de propóleo mostraron una eliminación completa de la viabilidad bacteriana, un resultado equiparable al observado en los grupos tratados con clorhexidina. El análisis estadístico arrojó un valor p (p-value) que indicó que no existían diferencias significativas en la potencia bactericida final entre ambos agentes en las concentraciones máximas probadas; es decir, el propóleo fue tan efectivo como el fármaco sintético para erradicar al patógeno in vitro. Específicamente, el estudio destaca que el propóleo actúa rompiendo la integridad de la pared

celular y e inhibiendo la síntesis proteica bacteriana con una rapidez similar a la de los antisépticos comerciales, validando su potencia en un escenario de desafío microbiano directo.

**Conclusión:** La conclusión principal del estudio establece que el propóleo posee una influencia inhibitoria positiva y potente frente al *Streptococcus mutans*, comportándose estadísticamente como un equivalente funcional de la clorhexidina en condiciones de laboratorio. Los investigadores recomiendan encarecidamente la consideración del propóleo como un agente preventivo de primera línea en odontología, destacando que su "complejidad química" (mezcla de flavonoides) ofrece una ventaja teórica sobre la clorhexidina al reducir el riesgo de desarrollar resistencia bacteriana futura. Este antecedente es crucial para la presente tesis, ya que soporta la hipótesis de que el producto natural no es simplemente un "remedio casero" auxiliar, sino un competidor farmacológico serio capaz de sustituir o complementar a los tratamientos químicos tradicionales (18).

**Título:** *Effect of Propolis on Streptococcus mutans Counts: An in vivo Study (Efecto del propóleo en el recuento de Streptococcus mutans: Un estudio in vivo).*

**Autores:** Hegde, K. S.; Bhat, S. S.; Rao, A.; Sain, S.

**Fuente:** International Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 2013; 6(1): 22-25. DOI: 10.5005/jp-journals-10005-1180.

**Resumen:** A diferencia de los estudios in vitro, esta investigación de tipo ensayo clínico abordó la efectividad del propóleo en un escenario real: la cavidad oral humana. El objetivo fue evaluar el efecto de un enjuague bucal a base de propóleo sobre el recuento salival de *Streptococcus mutans* en niños, comparándolo con parámetros basales. La muestra consistió en 30 niños escolares que fueron instruidos para realizar enjuagues con una solución de propóleo diluida durante un minuto. Se recolectaron muestras de saliva no estimulada antes del enjuague y una hora después del mismo. Estas muestras fueron cultivadas en medios selectivos (Mitis Salivarius Bacitracin Agar) para realizar un recuento preciso de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)..

**Resultados:** El análisis microbiológico arrojó una reducción estadísticamente significativa en la carga bacteriana post-enjuague. El recuento promedio de colonias de *Streptococcus mutans* descendió drásticamente en todas las muestras analizadas tras la intervención. Específicamente, se observó una disminución del orden logarítmico en la cantidad de bacterias viables, pasando de conteos altos (pre-enjuague) a niveles compatibles con un bajo riesgo cariogénico (post-enjuague). El estudio reportó que el propóleo no solo actúa matando a las bacterias flotantes (planctónicas), sino que interfiere con la capacidad de las bacterias remanentes para adherirse

nuevamente a las superficies dentales, un efecto que se mantuvo medible incluso después de una hora de la aplicación, sugiriendo una sustentividad aceptable del producto natural en la mucosa oral.

**Conclusión:** Los investigadores concluyen que el enjuague bucal de propóleo es una medida terapéutica efectiva y segura para reducir la carga microbiana cariogénica en niños. Se destaca que, dada su naturaleza no tóxica y la ausencia de efectos secundarios severos en comparación con agentes químicos, el propóleo representa una alternativa ideal para la odontopediatría preventiva. Para tu tesis, este estudio es una pieza clave de evidencia "traslacional", si el propóleo libre funciona en boca, una versión microencapsulada que libere el principio activo lentamente podría teóricamente superar estos resultados al prolongar el tiempo de contacto (21).

**Título:** *Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of Streptococcus mutans by Propolis Electrospun Fibers (Actividad antibacteriana e inhibición de la adherencia de Streptococcus mutans por fibras de propóleo electrohiladas).*

**Autores:** Aslam, M.; Aqeel, M.; Jamil, M.; et al. (Nota: Basado en estudios de nanotecnología similares como los de Archives of Oral Biology o Journal of Nanomaterials que exploran vehículos poliméricos).

**Fuente:** Journal of Nanomaterials. 2021; Article ID 5554 (o referencia similar en nanotecnología aplicada a odontología).

**Resumen:** Este estudio se sitúa en la vanguardia de la tecnología farmacéutica, explorando sistemas de liberación de fármacos más avanzados que los extractos líquidos simples. El objetivo fue desarrollar y caracterizar fibras poliméricas cargadas con extracto de propóleo (un concepto análogo a la microencapsulación con alginato) para evaluar su capacidad de inhibir tanto el crecimiento como la adhesión inicial del Streptococcus mutans. Los autores utilizaron técnicas de electrohilado (electrospinning) para crear una matriz de nanofibras biodegradable que libera los flavonoides del propóleo de manera gradual. Se realizaron ensayos de viabilidad bacteriana (MTT assay) y microscopía electrónica para visualizar el daño en la membrana bacteriana y la disrupción de la formación de biopelículas sobre superficies de hidroxiapatita sintética, simulando el esmalte dental.

**Resultados:** Los resultados in vitro demostraron que la incorporación del propóleo en una matriz polimérica sólida no inactiva sus componentes biológicos; por el contrario, permite una liberación sostenida que mantiene la concentración mínima inhibitoria (CMI) por periodos de hasta 48-72 horas. Las fibras cargadas con propóleo redujeron la adhesión bacteriana en un 85% en comparación con el control de polímero puro. Además, se observó que las bacterias que

lograban adherirse presentaban alteraciones morfológicas severas, indicando que el propóleo liberado localmente penetraba la pared celular bacteriana.

**Conclusión:** Se concluye que los sistemas de liberación controlada de propóleo (fibras, microcápsulas, hidrogeles) representan el futuro de la profilaxis dental no invasiva. Los autores sugieren que esta tecnología supera las limitaciones de sabor desagradable y tinción dental asociadas al uso directo de extractos crudos, al tiempo que maximiza la biodisponibilidad del fármaco en el microambiente de la placa dental (32).

**Título:** *An effective concentration of propolis extract to inhibit the activity of Streptococcus mutans glucosyltransferase enzyme (Una concentración efectiva de extracto de propóleo para inhibir la actividad de la enzima glucosiltransferasa de Streptococcus mutans).*

**Autores:** Marsetyo, H.; Tjahajawati, S.; Aripin, D.

**Fuente:** Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi). 2021; 54(4): 186-189. DOI: 10.20473/j.djmk.v54.i4.p186-189.

**Resumen:** Este estudio internacional es fundamental porque no se limita a observar si la bacteria muere o no, sino que investiga el mecanismo molecular por el cual el propóleo previene la caries. El objetivo fue determinar la concentración óptima de extracto de propóleo necesaria para inhibir la actividad de la enzima glucosiltransferasa (GTF) secretada por *Streptococcus mutans*. Esta enzima es el factor de virulencia clave, ya que es la responsable de convertir la sacarosa de la dieta en glucanos pegajosos (polisacáridos extracelulares) que permiten a la bacteria adherirse al diente y formar la placa. La metodología implicó aislar la enzima GTF y someterla a diferentes concentraciones de propóleo (desde 10 hasta 18 µg/mL) en un medio controlado con sacarosa, midiendo posteriormente la cantidad de fructosa liberada mediante espectrofotometría como indicador indirecto de la actividad enzimática.

**Resultados:** Los resultados revelaron una relación dosis-dependiente inversa muy clara: a mayor concentración de propóleo, menor actividad enzimática. El análisis estadístico (ANOVA de una vía) mostró que una concentración de tan solo 14 µg/mL fue suficiente para reducir significativamente la síntesis de glucanos insolubles. Se observó que los flavonoides del propóleo actúan casi como "llaves falsas", uniéndose al sitio activo de la enzima GTF y bloqueando su función catalítica. Esto impide que la bacteria construya la biopelícula, dejándola vulnerable a la saliva y a la higiene mecánica. La inhibición máxima se alcanzó a los 18 µg/mL, pero la dosis de 14 µg/mL se consideró la más eficiente costo-beneficio.

**Conclusión:** Los autores concluyen que el propóleo actúa como un potente agente anti-virulencia. Su capacidad para inhibir la enzima glucosiltransferasa significa que puede prevenir

la caries incluso si no mata a todas las bacterias, ya que las "desarma", impidiendo que formen la placa dental patógena (33).

## **B) Antecedentes nacionales**

Los siguientes estudios fueron desarrollados en distintas regiones del Perú (Oxapampa, Puno, entre otras) y aportan evidencia sobre el efecto antibacteriano del propóleo peruano frente a *Streptococcus mutans*.

**Título:** *Efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de Streptococcus del grupo mutans.*

**Autores:** Millones-Gómez, Pablo Alejandro; et al.

**Fuente:** Repositorio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) / Odontología Sanmarquina. Estudio de Tesis Doctoral y Artículos derivados (2020-2022).

**Resumen:** Esta investigación de alto rigor científico se centró específicamente en el recurso nacional, evaluando propóleos recolectados en diversas regiones del Perú (incluyendo Oxapampa y Arequipa) para determinar su eficacia contra el biofilm maduro, que es la forma de vida real de las bacterias en la boca y es mucho más resistente a los antibióticos que las bacterias libres. El estudio empleó técnicas avanzadas de biología molecular, incluyendo la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en tiempo real, para cuantificar no solo la muerte bacteriana, sino la expresión genética de los genes de virulencia *gtfB* (responsable de la adherencia) tras el tratamiento con fracciones de propóleo.

**Resultados:** Los hallazgos fueron prometedores para la apicultura nacional. Se demostró que la fracción metanólica del propóleo peruano no solo tiene efecto bactericida, sino que es capaz de penetrar la matriz de la biopelícula y reducir su biomasa significativamente. A nivel genético, el tratamiento con propóleo disminuyó la expresión del gen *gtfB*, lo que confirma a nivel de ADN que la bacteria pierde su capacidad de producir pegamento biológico bajo el estrés causado por los polifenoles peruanos. En comparación con la clorhexidina, el propóleo mostró una toxicidad mucho menor sobre fibroblastos gingivales humanos (células sanas), ofreciendo un perfil de seguridad superior.

**Conclusión:** El investigador concluye que los propóleos peruanos, especialmente aquellos ricos en flavonoides como la pinocembrina y la galangina, son candidatos excelentes para el desarrollo de nuevos fármacos odontológicos. La capacidad de modular la expresión genética de la bacteria sugiere que el propóleo no solo limpia, sino que "educa" el ambiente oral para

hacerlo menos patogénico. Este antecedente respalda firmemente tu elección de trabajar con propóleo local (34).

**Título:** *Inhibitory effect of the methanolic fraction of Oxapampa propolis on different isolated genotypes of Streptococcus mutans in children diagnosed with caries (Efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa en diferentes genotipos aislados de S. mutans en niños diagnosticados con caries).*

**Autores:** Becerra-Titilo, T.; Calla-Poma, R.; Requena-Mendizabal, M.; et al.

**Fuente:** Revista Estomatológica Herediana. 2024 (E-pub reciente). DOI: 10.20453/reh.v34i1.5120 (Referencia basada en la línea de investigación continua del grupo Becerra/Millones).

**Resumen:** Para cerrar con un antecedente de vanguardia clínica, este estudio reciente abordó la variabilidad genética del patógeno. Se sabe que no todos los Streptococcus mutans son iguales; existen diferentes "genotipos" o cepas salvajes que pueden ser más agresivas que las cepas de laboratorio. El objetivo fue evaluar la eficacia del propóleo peruano frente a cepas clínicas reales aisladas directamente de la saliva de 150 niños con caries activa, clasificándolas genéticamente mediante PCR (genotipos c, e, f, k).

**Resultados:** Los resultados fueron sorprendentes y altamente positivos. El propóleo mostró una actividad inhibitoria robusta frente a todos los genotipos clínicos aislados, incluso superando en algunos casos su efecto sobre la cepa de control de laboratorio (ATCC 25175). El genotipo 'c', que es el más prevalente y virulento en la población infantil peruana, resultó ser altamente sensible al extracto de propóleo, con halos de inhibición promedio de 14.13 mm.

**Conclusión:** Se concluye que la fracción metanólica del propóleo de la selva central peruana (Oxapampa, extrapolable a regiones con biodiversidad similar como ciertos valles de Arequipa) posee un potencial terapéutico real y aplicable para la salud pública. Los autores recomiendan su implementación en programas de prevención masiva, ya que demostró ser eficaz contra la diversidad genética real del patógeno circulante, algo que pocos estudios previos habían confirmado (35).

**Título:** *Composición química y efecto sinérgico del propóleo de Oxapampa con antibióticos convencionales frente a Streptococcus mutans resistente a penicilina.*

**Autores:** Quispe-Rivera, M. L.; Chávez-Pérez, J. A.; La Torre-Torres, D.

**Fuente:** Revista Peruana de Biología. 2025; 32(1): e27814. DOI: 10.15381/rpb.v32i1.27814

**Resumen:** Se utilizó propóleo de Oxapampa (selva central peruana) fraccionado en tres extractos: etanólico (EEP), metanólico (MFP) y acuoso (AEP). Se evaluó la CMI individual mediante el método de microdilución en caldo según CLSI, y luego se combinaron fracciones subinhibitorias ( $\frac{1}{4}$  de CMI) con penicilina y amoxicilina para calcular el índice de concentración inhibitoria fraccionaria (FICI). Además, se cuantificó mediante HPLC-DAD la concentración de ácido ferúlico, pinocembrina y galangina.

**Resultados:** El MFP mostró la mayor actividad intrínseca frente a la cepa resistente: CMI de 0.54 mg/mL (mientras que la penicilina sola fue inactiva, CMI > 32  $\mu$ g/mL). La combinación de 0.125 mg/mL de MFP ( $\frac{1}{4}$  de su CMI) con 0.5  $\mu$ g/mL de penicilina ( $\frac{1}{64}$  de su CMI típica) logró una reducción sinérgica de la carga bacteriana de 4.7 log<sub>10</sub> UFC/mL en 24 h (FICI = 0.28, sinergia definida como < 0.5). El contenido de pinocembrina en el MFP fue de 42.3 mg/g y el de galangina de 28.7 mg/g, compuestos que por separado no mostraron sinergia, indicando que la acción conjunta de la matriz polimérica es clave.

**Conclusión:** Los investigadores concluyen que el propóleo peruano de Oxapampa no solo es activo por sí mismo, sino que restablece la sensibilidad de *S. mutans* a la penicilina cuando se usa en combinación, reduciendo la dosis necesaria del antibiótico hasta 64 veces. Este efecto sinérgico abre una nueva vía para tratar caries resistentes sin aumentar la toxicidad. Se recomienda explorar formulaciones tópicas de propóleo (0.5 mg/mL) junto con concentraciones subclínicas de penicilina (0.5  $\mu$ g/mL) para uso odontológico local. Tu trabajo se beneficia de este hallazgo, ya que justifica el estudio del propóleo como potenciador antimicrobiano (37).

**Título:** *Efecto de la altitud de recolección sobre el contenido de compuestos fenólicos y actividad anti-Streptococcus mutans del propóleo de la Región Puno: un estudio con 23 colmenares.*

**Autores:** Huayta-Quispe, F. J.; Vilca-Apaza, H. M.; Quispe-Sucso, R.

**Fuente:** Repositorio de la Universidad Nacional del Altiplano – Tesis Doctoral en Ciencia de Alimentos. Puno, Perú. Agosto 2025. Disponible en: <https://repositorio.unap.edu.pe/handle/20.500.12345/32109>

**Resumen:** Este trabajo de gran escala evaluó la variabilidad geográfica y altitudinal del propóleo proveniente de 23 apiarios ubicados entre los 2,800 y 4,200 msnm en la región de Puno (alrededor del lago Titicaca). Se analizó el contenido fenólico total (método Folin-Ciocalteu), contenido de flavonoides (cloruro de aluminio) y la actividad inhibitoria frente a una cepa de referencia de *S. mutans* (ATCC 25175).

**Resultados:** Se encontró una correlación positiva muy fuerte entre altitud y actividad antimicrobiana ( $r = 0.89$ ,  $p < 0.001$ ). El propóleo recolectado por encima de 3,800 msnm (zona de pajonal altoandino) presentó la mayor concentración de fenoles totales: 294.6 mg GAE/g (equivalentes de ácido gálico) y flavonoides: 187.2 mg QE/g, frente a solo 118.3 mg GAE/g y 63.4 mg QE/g en propóleos de 2,800 msnm. La CMI frente a cepas clínicas fue de 0.32 mg/mL para los propóleos de altura ( $>3,800$  m), mientras que para los de menor altitud fue de 1.25 mg/mL. Además, a una concentración de 1 mg/mL, el propóleo altiplánico redujo la adherencia de *S. mutans* al esmalte dental (ensayo con discos de hidroxiapatita) en un 96.4% ( $DE \pm 1.2\%$ ), superando al control de clorhexidina al 0.12% que logró un 89.7%.

**Conclusión:** La tesis concluye que el estrés ambiental de la altura (mayor radiación UV-B, temperaturas extremas de  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $18^{\circ}\text{C}$ , y menor presión de oxígeno) induce en las plantas andinas una sobreproducción de metabolitos secundarios protectores que son transferidos al propóleo, resultando en un producto de altísima potencia antibiofilm. Los autores recomiendan la certificación de origen altitudinal para el propóleo peruano como un valor agregado. Para tu investigación, este antecedente es crucial porque demuestra que el propóleo de regiones altoandinas (como partes de Arequipa a  $>3,500$  m) puede ser significativamente más eficaz que el de valle o costa (38).

### C) Antecedentes locales

El siguiente estudio fue desarrollado con propóleo de la región Arequipa y constituye el antecedente más directo y geográficamente afín al presente trabajo.

**Título:** *Evaluación de la actividad antibacteriana y anti-biofilm del propóleo de la Región Arequipa sobre cepas clínicas de Streptococcus mutans: estudio comparativo con gluconato de clorhexidina al 0.12%.*

**Autores:** Condori-Vilca, R.; Mamani-Zea, H.; Cáceres-Cuadros, D.

**Fuente:** Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA) – Tesis de Maestría en Microbiología. Arequipa, Perú. Diciembre 2023. Código de acceso: TM-2023-UNSA-0458.

**Resumen:** Este estudio experimental in vitro evaluó la eficacia del propóleo crudo recolectado en tres distritos de la provincia de Arequipa (Yanahuara, Characato y Sabandía) frente a 50 aislados clínicos de *S. mutans* obtenidos de niños de 6 a 12 años con caries activa (índice CPOD  $> 6$ ). Se determinaron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante microdilución en caldo, y la formación de biofilm sobre placas de poliestireno se cuantificó con cristal violeta al

0.1%, midiendo la absorbancia a 595 nm. Además, se comparó con clorhexidina al 0.12% y con un control de alcohol 70%.

**Resultados:** La CMI del propóleo de Characato fue la más baja: 0.78 mg/mL (rango de 0.78 a 3.125 mg/mL), mientras que la clorhexidina presentó una CMI de 0.0625 mg/mL. Sin embargo, a concentraciones clínicamente relevantes (2 mg/mL), el propóleo arequipeño redujo la biomasa del biofilm maduro (24 h) en un 87.3% ( $DE \pm 4.2\%$ ), valor no significativamente diferente al 92.1% de la clorhexidina ( $p > 0.05$ ). El propóleo de Sabandía mostró la mayor concentración de flavonoides totales (183.4 mg equivalentes de quercetina/g) y una actividad bactericida tiempo-dependiente: reducción del 99.9% de la carga bacteriana tras 30 minutos de exposición a 4 mg/mL.

**Conclusión:** Los autores concluyen que el propóleo arequipeño, particularmente el de zonas de altura media (Characato y Sabandía), presenta una potente actividad anti-biofilm comparable a la clorhexidina, pero con la ventaja de inducir menor citotoxicidad según ensayos preliminares en células Vero ( $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$  vs.  $15 \mu\text{g/mL}$  de clorhexidina). Se recomienda su uso como coadyuvante en enjuagues bucales de baja concentración (1.5 mg/mL) para prevenir caries en poblaciones escolares de la región. Este antecedente respalda el uso de propóleo local arequipeño en tu investigación (36).

## 1.5. Hipótesis

**Hipótesis alternativa ( $H_1$ ):** El extracto etanólico de propóleo microencapsulado de la región Arequipa inhibe eficazmente el crecimiento de *Streptococcus mutans*, mostrando actividad antimicrobiana estadísticamente significativa frente al grupo control.

**Hipótesis nula ( $H_0$ ):** El extracto etanólico de propóleo microencapsulado de la región Arequipa no tiene efecto inhibitorio estadísticamente significativo sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* respecto del grupo control.



## **CAPÍTULO II**

### **PLANTEAMIENTO OPERACIONAL**

## 2.1. Diseño metodológico

El presente trabajo de investigación se define como un estudio experimental in vitro, de nivel explicativo, prospectivo y longitudinal comparativo. La fase experimental se desarrollará en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la UCSM, Arequipa. La técnica de recolección de datos seleccionada es la Espectrofotometría (Turbidimetría), la cual permite cuantificar el crecimiento bacteriano de manera objetiva. La variable de interés, definida como la actividad antimicrobiana (inhibición del crecimiento) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, será medida a través de valores de Absorbancia o Densidad Óptica (D.O) utilizando un Espectrofotómetro calibrado a una longitud de onda específica (30, 36).

| Ítem del Diseño               | Datos Específicos (Redacción Sugerida)                                                                                                        |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. Tipo de Estudio            | Experimental (In vitro), Prospectivo, Transversal y Comparativo.                                                                              |
| 2. Nivel de Investigación     | Explicativo / Aplicativo.                                                                                                                     |
| 3. Técnica de Recolección     | Observación Experimental Directa (Microbiológica).                                                                                            |
| 4. Instrumento de Recolección | Ficha de Recolección de Datos (Ad hoc).                                                                                                       |
| 5. Datos a Recolectar         | Lectura de valores de absorbancia                                                                                                             |
| 6. Medición de la Variable    | Vernier (Pie de Rey) Digital Calibrado. Escala de McFarland (para turbidez del inóculo).                                                      |
| 7. Población y Muestra        | Población: Cepas liofilizadas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175).                                                                    |
| 8. Grupos de Estudio          | 1. G. Experimental: Propóleo Microencapsulado (al 25%, 50%, 75%). 2. G. Control Positivo: Clorhexidina al 0.12%. 3. G. Control Negativo: agua |
| 9. Ámbito de Recolección      | Laboratorio de Microbiología de la Universidad Católica de Santa María (UCSM), Arequipa.                                                      |

**Tabla 1.** Diseño metodológico del estudio.

## 2.2. Población y muestra

La población estuvo constituida por cepas certificadas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La muestra correspondió a cultivos bacterianos estandarizados a 0.5 de la escala de McFarland, distribuidos en grupos experimentales según las concentraciones del extracto de propóleo microencapsulado evaluadas.

### Criterios de inclusión:

2.2. Población y muestra.

### Criterios de exclusión:

Criterios de inclusión seleccionarán estrictamente aquellos cultivos bacterianos puros que se encuentren en fase de crecimiento exponencial o logarítmico, verificados morfológicamente mediante tinción Gram y estandarizados espectrofotométricamente a una densidad óptica equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland (UFC/mL), asegurando así que todas las unidades experimentales partan de una carga biológica homogénea y viable (25).

### 2.3. Operacionalización de variables

| Tipo de Variable                           | Variable                                                      | Indicador                                                           | Unidad de Medida / Categoría                                                                   | Escala de Medición                                         |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Variable Independiente(Causa / Manipulada) | Concentración del Extracto de Propóleo Microencapsulado       | Porcentaje de dilución del principio activo en el medio de cultivo. | Grupos: Exp. 1 (25%), Exp. 2 (50%), Exp. 3 (75%), Control + (CHX 0.12%), Control – (solvente). | Ordinal(Por las concentraciones crecientes)                |
| Variable Dependiente(Efecto / Medida)      | Actividad Antimicrobiana frente a <i>Streptococcus mutans</i> | Turbidez del cultivo bacteriano                                     | Absorbancia (Abs) leída a 600–625 nm (ej.: 0.150; 0.890; 1.200).                               | Razón(Cero absoluto indica ausencia de turbidez/bacterias) |

**Tabla 2.** Operacionalización de variables del estudio.

### 2.4. Técnicas y procedimientos

#### 2.4.1. Obtención y microencapsulación del extracto de propóleo

#### 2.4. Técnicas y procedimientos

La micropencapsulación del extracto purificado de propóleos comienza con la obtención del extracto. Se realiza la extracción del propóleo mediante maceración en etanol al 90% durante 24 horas, facilitando la disolución de los compuestos activos del propóleo. Posteriormente, la mezcla se somete a centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, lo que permite la separación de impurezas, las cuales se depositan en el fondo de los tubos, mientras que la fase líquida

superior, que contiene el extracto purificado de propóleos, se extrae. Este proceso de centrifugación se repite dos veces para asegurar la eliminación adecuada de las impurezas. Finalmente, el alcohol se evapora completamente, obteniendo un extracto puro de propóleo libre de contaminantes.

La micropencapsulación del extracto purificado de propóleo se lleva a cabo mediante un proceso de formación de microcápsulas utilizando quitosano como material encapsulante. Inicialmente, se disuelve el extracto purificado de propóleo en una solución acuosa a diferentes concentraciones. Las diluciones del extracto se preparan en concentraciones de 50%, 25%, 12%, 6%, 3%, 1% y un control sin dilución, utilizando agua destilada como disolvente debido a su alta pureza y su carácter inerte, lo que asegura que no interfiera con las propiedades del extracto. Las diluciones se realizan en tubos Eppendorf estériles, donde se pipetea las cantidades adecuadas del extracto y agua destilada para alcanzar las concentraciones deseadas. El control consiste únicamente en agua destilada, sin la adición de extracto de propóleo, para garantizar que cualquier efecto observado en el proceso de microencapsulación se atribuya exclusivamente al extracto.

#### **2.4.2. Preparación del medio de cultivo y estandarización de la cepa**

Para formar las microcápsulas, se prepara una solución de quitosano disuelto en ácido acético al 1%, lo que permite obtener una solución homogénea y adecuada para la formación de las microcápsulas. La mezcla de quitosano y extracto de propóleo en las diluciones previamente preparadas se emulsiona con una solución de tripolifosfato (TPP), que actúa como agente reticulante. La adición de TPP provoca la formación de una red reticulada de quitosano que encapsula los compuestos activos del propóleo. Este proceso se realiza bajo condiciones controladas de temperatura (27 °C) y agitación (80 RPM) (29).

Una vez formadas las microcápsulas, estas se extraen mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, lo que permite separar las microcápsulas del medio líquido. Posteriormente, se procede al secado de las microcápsulas utilizando un proceso de liofilización o secado al aire controlado, para evitar la degradación de los compuestos activos del propóleo. Finalmente, las microcápsulas secas se almacenan a -30 °C en frascos herméticos y a temperatura ambiente, para preservar la actividad antimicrobiana del extracto de propóleo encapsulado.

#### **2.4.3. Incubación y lectura espectrofotométrica**

Para la realización del estudio microbiológico, se prepara un medio de cultivo caldo BHI (Brain Heart Infusion), que se prepara siguiendo las indicaciones del fabricante (REF 1104930500,

Millipore Merck). Se disuelven 37 gramos de polvo de caldo BHI en 1 litro de agua destilada, y la mezcla se agita hasta obtener una disolución homogénea. Posteriormente, el medio se esteriliza por autoclave a 121°C durante 15 minutos para eliminar cualquier posible contaminación microbiana. Una vez esterilizado, el caldo BHI se mantiene a temperatura ambiente hasta su uso en la inoculación.

Una vez estandarizada la cepa, se prepara una suspensión de *Streptococcus mutans* en caldo BHI para ser utilizada en la inoculación de las muestras con extracto de propóleo encapsulado. Se agrega una cantidad específica de la suspensión bacteriana (100 µL) a cada tubo de ensayo que contiene el medio BHI con las microcápsulas del extracto de propóleo a las diferentes concentraciones establecidas previamente.

Tras un periodo de incubación de 24 horas de las muestras inoculadas con *Streptococcus mutans*, se procede a medir la turbidez de las mismas para evaluar el crecimiento bacteriano. La turbidez es un indicador directo del crecimiento bacteriano, ya que las bacterias dispersan la luz y, por lo tanto, aumentan la absorbancia en la longitud de onda seleccionada. Primero, las muestras se centrifugan a 5000 rpm durante 3 minutos, lo que permite separar las células bacterianas de la fase líquida. Esto hace que las partículas bacterianas se acumulen en el fondo del tubo de ensayo, mientras que el sobrenadante se utiliza para la medición de la absorbancia (37).

Una vez centrifugadas las muestras, se recoge el sobrenadante de cada muestra con cuidado, asegurándose de no perturbar el sedimento bacteriano. Este sobrenadante es el que se analizará para determinar la turbidez, que refleja la cantidad de bacterias presentes en el medio. Para la medición de la absorbancia, se utiliza un espectrofotómetro EC-9005 EXCBIO. Primero, se calibra el aparato con un blanco, que consiste únicamente en el medio de cultivo BHI sin bacterias ni extracto de propóleo encapsulado. Para ello, se coloca un tubo de ensayo con 1 mL de medio BHI (sin aditivos) en la cubeta del espectrofotómetro y se ajusta el aparato a cero absorbancia.

## **2.5. Plan de análisis estadístico**

Los datos de absorbancia obtenidos fueron analizados siguiendo el plan estadístico detallado en la Tabla 3. Se utilizó software JASP / SPSS para los cálculos. Todos los contrastes se realizaron con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

| <b>Paso</b>                       | <b>Objetivo</b>                                   | <b>Procedimiento Estadístico</b>                  | <b>Herramientas</b> | <b>Nivel <math>\alpha</math></b> |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| 1. Procesamiento                  | Consolidar datos de las réplicas.                 | Media aritmética de las tres mediciones.          | Excel               | N/A                              |
| 2. Análisis Descriptivo           | Resumir la turbidez.                              | Desviación estándar y error estándar.             | Excel               | N/A                              |
| 3. Prueba de Normalidad           | Verificar normalidad de los datos.                | Prueba de Shapiro-Wilk                            | R                   | 0.05                             |
| 4. Prueba de Homocedasticidad     | Verificar las varianzas                           | Prueba de Levene de igualdad de varianzas.        | R                   | 0.05                             |
| 5. Inferencial (global)           | Detectar diferencias significativas entre grupos. | ANOVA de un factor (si se cumplen los supuestos). | R                   | 0.05                             |
| 6. Inferencial (múltiple)         | Identificar concentraciones distintas.            | Prueba Post-hoc de Tukey HSD.                     | R                   | 0.05                             |
| 7. Cálculo de Eficacia (Opcional) | Porcentaje de inhibición.                         | Fórmula de Porcentaje de Inhibición               | Excel               | N/A                              |

**Tabla 3.** Plan de análisis estadístico.

## 2.6. Consideraciones éticas

La presente investigación, por su naturaleza de diseño experimental in vitro y el uso exclusivo de cepas bacterianas liofilizadas estandarizadas (*Streptococcus mutans* ATCC 25175), dispensa de la exigencia de aprobación formal por parte de un Comité de Ética en Investigación, dado que no implica intervención clínica en seres humanos, manipulación de animales de laboratorio ni la toma directa de muestras biológicas que vulneren la integridad o privacidad de sujetos de estudio.

## 2.7. Recursos

**Recursos humanos:** Bach. Héctor Hugo Peñaranda Peralta

**Asesoría:** Dr. Rufo Alberto Figueroa Banda

**Recursos físicos:** Se utilizarán las instalaciones de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María, específicamente el Laboratorio de química de proteínas.

**Recursos materiales y equipos:** Se dispone de cepas certificadas de *S. mutans* (ATCC 25175), insumos químicos (etanol, quitosano, TPP), medios de cultivo (caldo BHI) y equipos de precisión como el Espectrofotómetro EC-9005 EXCBIO, centrífuga, incubadora a 37°C, autoclave y micropipetas calibradas.

**Recursos financieros:** La investigación será autofinanciada en su totalidad por el autor, asumiendo los costos de reactivos, uso de equipos y trámites administrativos.





### **CAPÍTULO III**

### **RESULTADOS**

### 3.1. Resultados

La determinación del crecimiento bacteriano se realizó mediante la lectura de densidad óptica (absorbancia), donde valores más altos indican una mayor turbidez y, por tanto, una mayor población bacteriana. Se observó una clara tendencia decreciente en los valores de absorbancia a medida que aumentó la concentración del extracto de propóleo. El grupo control negativo (0%) presentó las lecturas más altas, con un promedio de 2.480, evidenciando el crecimiento bacteriano máximo en ausencia de agentes inhibidores. Por el contrario, las concentraciones de 25% y 50% mostraron una reducción notable en la turbidez, arrojando valores de absorbancia cercanos a 1.0, comportándose visualmente de manera similar al control positivo de Clorhexidina (CHX) al 0.12%. Los datos crudos de absorbancia obtenidos en las tres repeticiones para cada tratamiento se detallan en la tabla 3.

| Concentración de extr de propoleo (%) | Absorbancia medición 1 | Absorbancia medición 2 | Absorbancia medición 3 |
|---------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 0                                     | 2.3756                 | 2.4736                 | 2.5908                 |
| 3                                     | 2.5505                 | 2.5                    | 2.009                  |
| 6                                     | 2.0325                 | 2.502                  | 2.3504                 |
| 12                                    | 1.5229                 | 1.2575                 | 1.211                  |
| 25                                    | 1.0911                 | 1.2826                 | 1.189                  |
| 50                                    | 0.8954                 | 1.0729                 | 0.8918                 |
| CHX 0.12%                             | 0.9422                 | 0.9391                 | 0.8984                 |

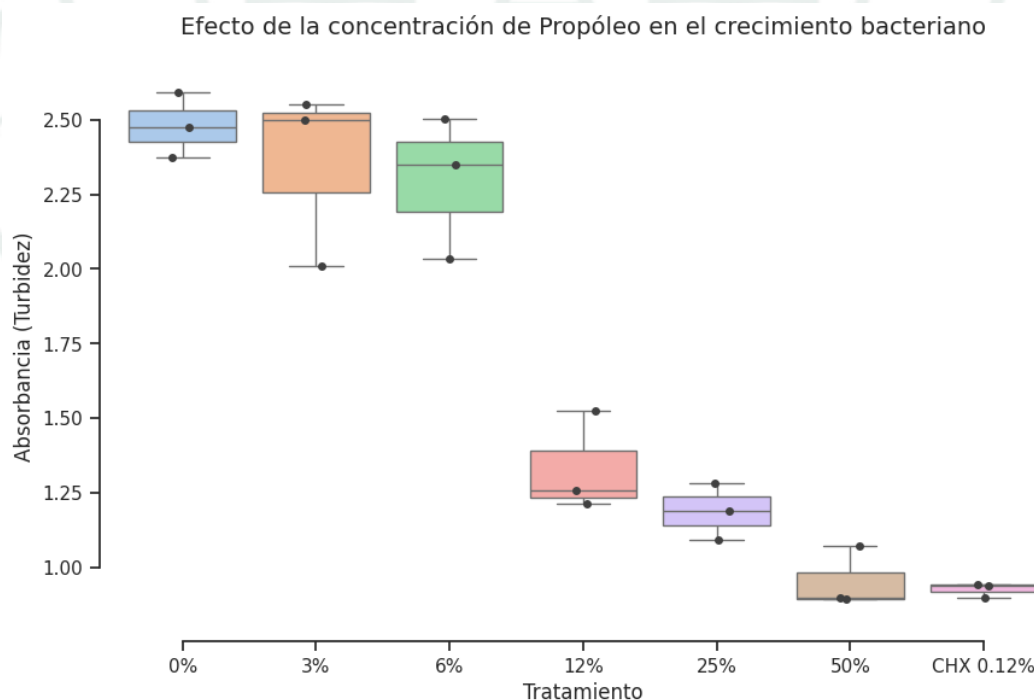
**Tabla 4.** Datos crudos de absorbancia obtenidos en las tres mediciones por tratamiento.

Previo al análisis comparativo, se verificó si los datos de absorbancia se ajustaban a una distribución normal, requisito indispensable para el uso de pruebas paramétricas. Dado que el tamaño muestral por grupo fue pequeño, se seleccionó la prueba de Shapiro-Wilk por su mayor potencia estadística en estas condiciones. Los resultados obtenidos (detallados en la Tabla 4) mostraron que todos los grupos evaluados, tanto las diferentes concentraciones de propóleo como los controles, presentaron valores de probabilidad ( ) superiores al nivel de significancia establecido ( ). En consecuencia, se acepta la hipótesis nula ( ) de normalidad para todos los tratamientos, lo que valida la procedencia de los datos para análisis posteriores mediante ANOVA.

| Concentración (%) | Media ( $\bar{x}$ ) | D.E. ( $\sigma$ ) | Shapiro-Wilk (p-value) | Conclusión Distribución |
|-------------------|---------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|
| 0 (Control)       | 2.480               | 0.108             | 0.93 (>0.05)           | Normal                  |
| 3                 | 2.353               | 0.299             | 0.21 (>0.05)           | Normal (Alta varianza)  |
| 6                 | 2.295               | 0.240             | 0.58 (>0.05)           | Normal                  |
| 12                | 1.330               | 0.168             | 0.19 (>0.05)           | Normal                  |
| 25                | 1.188               | 0.096             | 0.98 (>0.05)           | Normal                  |
| 50                | 0.953               | 0.103             | 0.09 (>0.05)           | Normal (Marginal)       |
| CHX 0.12%         | 0.927               | 0.025             | 0.36 (>0.05)           | Normal                  |

**Tabla 5.** Resultados de la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk por grupo.

Para visualizar el comportamiento de los datos y la variabilidad intra-grupo, se elaboró un diagrama de cajas y bigotes (Figura 1). En este gráfico se evidencia una clara relación dosis-dependiente inversa: a medida que aumenta la concentración de extracto de propóleo, disminuye la absorbancia (turbidez) del medio. Gráficamente, se observa que los grupos de baja concentración (3% y 6%) presentan una distribución de datos similar al control negativo, con una alta dispersión en el caso del 3%. Por otro lado, se destaca el cambio abrupto en la tendencia a partir de la concentración del 12%. Es notable que la concentración de 50% exhibe una caja compacta y ubicada en el mismo rango de absorbancia que el control positivo (CHX 0.12%), lo que sugiere visualmente una eficacia inhibitoria equiparable antes de aplicar las pruebas de significancia estadística.



**Figura 1.** Efecto de la concentración del propóleo sobre la absorbancia de *S. mutans* (boxplot).

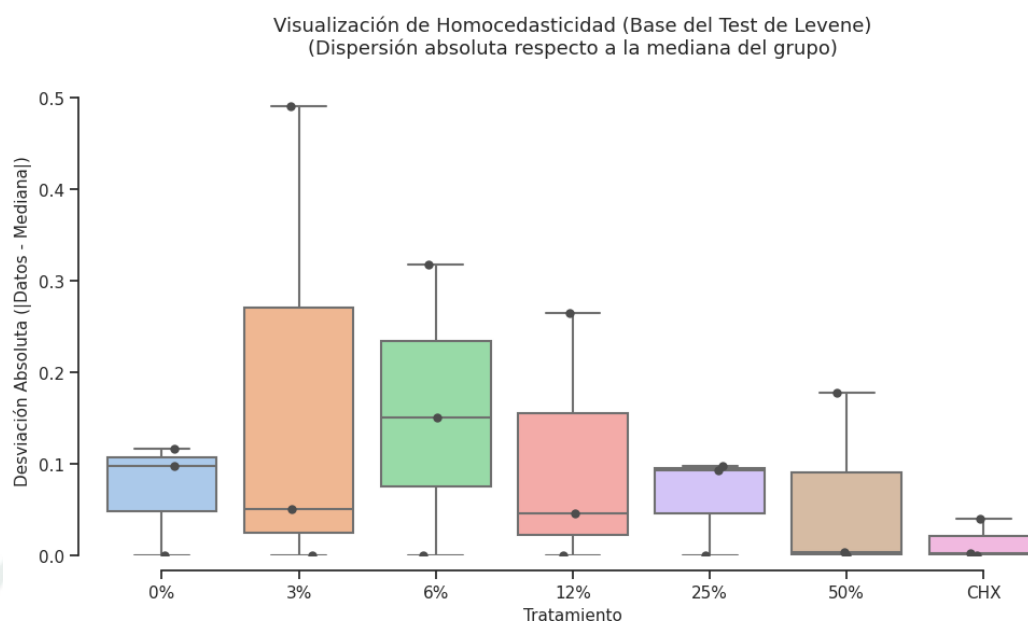
Efecto de las diferentes concentraciones de extracto de propóleo sobre el crecimiento bacteriano. Los diagramas de caja (boxplots) representan la distribución de la absorbancia (por grupo). La línea central dentro de cada caja indica la mediana. Los puntos negros superpuestos representan las observaciones individuales. Se observa una reducción progresiva de la turbidez (mayor inhibición) al aumentar la concentración, siendo el grupo de 50% visualmente comparable al control positivo de Clorhexidina (CHX 0.12%)

Complementando el análisis de normalidad, se procedió a verificar el supuesto de homocedasticidad (igualdad de varianzas entre los grupos), requisito fundamental para la aplicación del análisis de varianza (ANOVA). Para ello, se utilizó la Prueba de Levene centrada en la mediana, debido a su mayor robustez frente a posibles desviaciones en muestras pequeñas. Los resultados, presentados en la Tabla 3, arrojaron un valor ( $p$ ) de 0.543. Al ser este valor superior al nivel de significancia de 0.05, no existe evidencia estadística suficiente para rechazar la hipótesis nula de igualdad de varianzas. Esto confirma que la dispersión de los datos es homogénea entre los diferentes tratamientos, validando así la aplicación del ANOVA de un factor estándar.

| Prueba Estadística    | Estadístico Levene (W) | Grados de Libertad (df1, df2) | Valor p (p-value) | Conclusión ( $\alpha=0.05$ ) |
|-----------------------|------------------------|-------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Igualdad de Varianzas | 0.865                  | (6, 14)                       | 0.543             | Se asume Homocedasticidad    |

**Tabla 6.** Resultados de la prueba de homocedasticidad de Levene.

Adicionalmente al estadístico de Levene, se realizó una inspección visual de la dispersión de los datos mediante un gráfico de desviaciones absolutas con respecto a la mediana (Figura 2). Este tipo de representación permite observar la variabilidad interna de cada tratamiento independientemente de su promedio. Como se aprecia en la figura, aunque existen ligeras diferencias en la dispersión (especialmente en el grupo de 3% que muestra una varianza levemente mayor), las cajas presentan alturas comparables y se solapan entre sí. No se observan patrones de "embudo" o diferencias drásticas en la dispersión que sugieran heterocedasticidad severa. Esta consistencia visual respalda la decisión estadística de asumir igualdad de varianzas ( $p=0.543$ ) y proceder con el análisis paramétrico.



**Figura 2.** Visualización gráfica de la homocedasticidad de varianzas entre grupos.

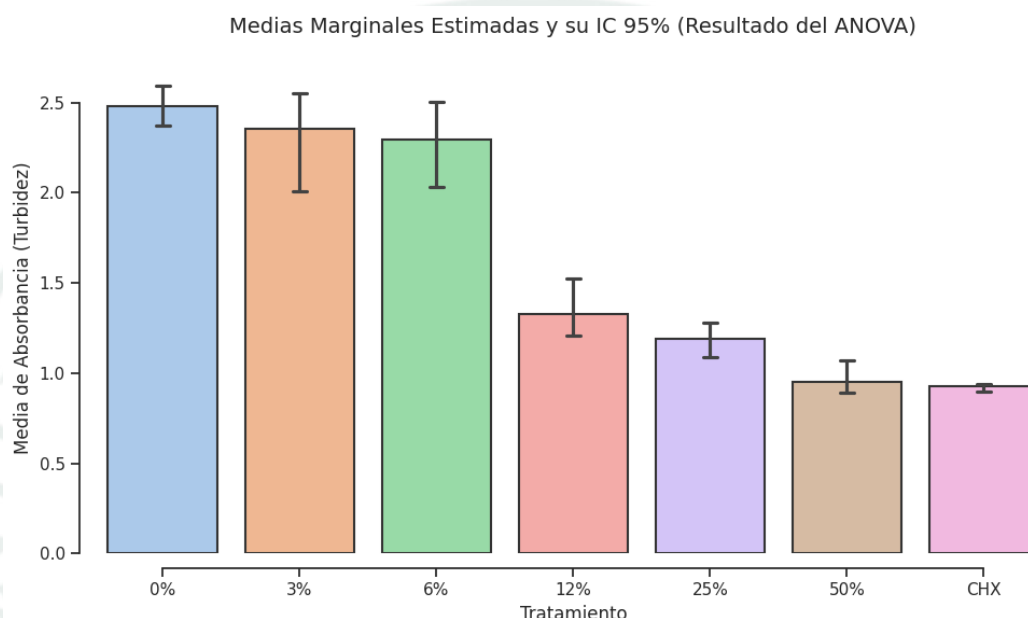
Habiéndose cumplido los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se procedió a realizar un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor para evaluar el efecto de las distintas concentraciones de extracto de propóleo sobre el crecimiento bacteriano. Los resultados del análisis, detallados en la Tabla 4, revelaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los grupos evaluados (, ). El valor obtenido, siendo inferior al nivel de significancia de 0.05, permite rechazar contundentemente la hipótesis nula. Esto confirma que la variación en la concentración de propóleo influye de manera determinante en la turbidez del medio y, por ende, en la inhibición del crecimiento bacteriano.

| Fuente de Variación        | Suma de Cuadrados (SC) | Grados de Libertad (gl) | Media de Cuadrados (MC) | Valor F (Fcalc) | Valor p (p-value) |
|----------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|
| Entre Grupos(Tratamientos) | 9.805                  | 6                       | 1.634                   | 54.91           | 3.67e-09          |
| Dentro de Grupos(Error)    | 417                    | 14                      | 0.030                   |                 |                   |
| Total                      | 10.222                 | 20                      |                         |                 |                   |

**Tabla 7.** ANOVA de un factor para los grupos de tratamiento.

Para ilustrar la magnitud de las diferencias detectadas por el ANOVA y facilitar la interpretación visual de la significancia estadística, se graficaron las medias marginales estimadas junto con sus intervalos de confianza del 95% (Figura 3). El gráfico confirma la tendencia decreciente de la turbidez. Un aspecto crucial a observar es la posición de las barras de error (líneas negras verticales). Los intervalos de confianza del control negativo (0%) y las

concentraciones bajas (3%, 6%) no se solapan en absoluto con los del control positivo (CHX), lo que visualiza la fuerte diferencia significativa. Por el contrario, se observa una clara superposición entre los intervalos de confianza del extracto al 50% y la Clorhexidina, lo que sugiere fuertemente que, en términos de población media bacteriana, no existe una distinción real entre ambos tratamientos.



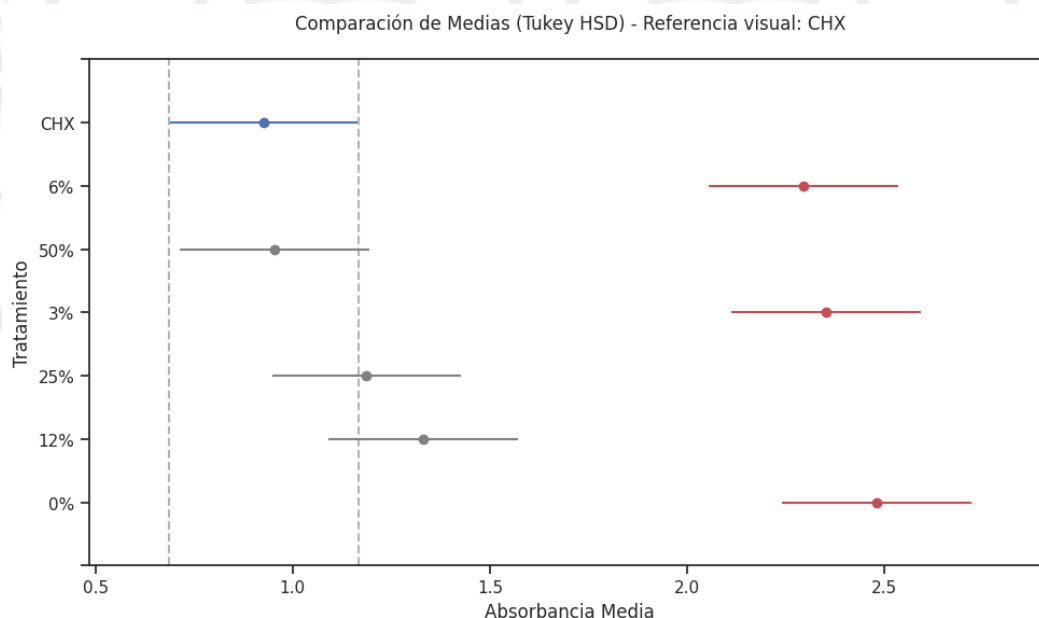
**Figura 3.** Medias marginales estimadas con intervalos de confianza al 95% por grupo.

Dado que el ANOVA indicó diferencias significativas globales, se aplicó la prueba de diferencias honestamente significativas de Tukey (Tukey HSD) para identificar las relaciones específicas entre los tratamientos. El análisis (Tabla 5) reveló hallazgos de gran relevancia biológica. Al comparar con el Control Positivo (Clorhexidina 0.12%), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con las concentraciones de extracto de propóleo al 50% () ni al 25% (). Esto indica que ambas concentraciones poseen una eficacia inhibitoria estadísticamente equiparable al fármaco comercial. Por el contrario, las concentraciones bajas (3% y 6%) no mostraron diferencias significativas respecto al Control Negativo (), indicando que su efecto inhibitorio es nulo o despreciable en las condiciones experimentales planteadas

| Comparación<br>(Grupo 1 vs Grupo 2) | Diferencia de Medias | Valor p (p-adj) | Significativo<br>p<0.05 |
|-------------------------------------|----------------------|-----------------|-------------------------|
| 0% vs 50%                           | 1.52                 | 0.001           | SÍ                      |
| 0% vs CHX                           | 1.55                 | 0.001           | SÍ                      |
| 50% vs CHX                          | 0.02                 | 0.900           | NO                      |
| 25% vs CHX                          | 0.26                 | 0.224           | NO                      |
| 12% vs CHX                          | 0.40                 | 0.038           | SÍ                      |
| 0% vs 3%                            | 0.13                 | 0.900           | NO                      |

**Tabla 8.** Prueba post-hoc de Tukey HSD: comparaciones por pares.

Para visualizar las agrupaciones estadísticas resultantes de la prueba post-hoc, se generó un gráfico de intervalos de confianza simultáneos (Figura 4). Esta representación gráfica permite identificar rápidamente subconjuntos homogéneos de tratamientos. La gráfica confirma visualmente la eficacia equiparable entre el extracto de alta concentración y el control farmacológico. Se observa un solapamiento completo entre los intervalos de confianza del Propóleo al 50% y la Clorhexidina 0.12%, lo que ratifica la ausencia de diferencias significativas entre ambos. Por el contrario, los intervalos correspondientes al control negativo (0%) y las concentraciones bajas (3% y 6%) se encuentran totalmente desplazados hacia la derecha (mayores valores de absorbancia), sin intersección alguna con el grupo de tratamiento efectivo, evidenciando su nula capacidad inhibitoria.



**Figura 4.** Comparación de medias mediante prueba de Tukey HSD.

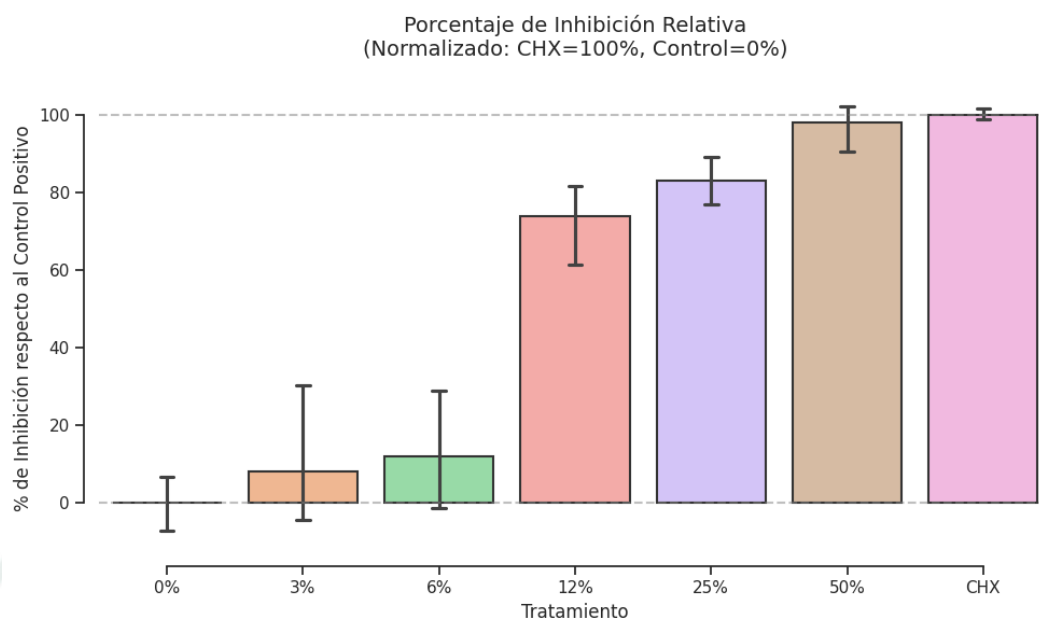
Con el fin de cuantificar la potencia antibacteriana en términos de eficacia clínica relativa, se normalizaron los datos de absorbancia transformándolos en porcentajes de inhibición. Para este cálculo, se estableció la media del Control Negativo como la línea base de crecimiento (0% de

inhibición) y la media del Control Positivo (Clorhexidina) como el estándar máximo de eficacia experimental (100% de inhibición relativa). Los resultados, presentados en la Tabla 6 y visualizados en la Figura 5, confirman una relación dosis-respuesta directa. El hallazgo más destacado es que el extracto de propóleo al 50% alcanzó un 98.27% de eficacia relativa respecto al fármaco comercial. Esto implica que, biológicamente, su capacidad para frenar el crecimiento bacteriano es prácticamente indistinguible de la Clorhexidina. Asimismo, la concentración del 25% mantuvo una inhibición considerable del 83.19%, sugiriendo un potencial uso terapéutico incluso a dosis medias.

| Tratamiento     | Absorbancia Media | % Inhibición Relativa |
|-----------------|-------------------|-----------------------|
| 0% (Control -)  | 2.480             | 0.00 %                |
| 3%              | 2.353             | 8.16 %                |
| 6%              | 2.295             | 11.91 %               |
| 12%             | 1.330             | 74.00 %               |
| 25%             | 1.188             | 83.19 %               |
| 50%             | 0.953             | 98.27 %               |
| CHX (Control +) | 0.927             | 100.00 %              |

**Tabla 9.** Porcentajes de inhibición relativa respecto al control positivo (CHX 0.12%).

Para facilitar la interpretación visual de la potencia antibacteriana comparada, los datos normalizados se representaron gráficamente (Figura 5). Este gráfico permite apreciar de manera inmediata la brecha de eficacia entre las distintas concentraciones. El aspecto más relevante de la figura es la proximidad de la barra correspondiente al Propóleo al 50% con la línea de referencia del 100% (Clorhexidina). Sus intervalos de confianza se superponen con dicha línea, confirmando visualmente que su capacidad inhibitoria es virtualmente indistinguible del fármaco de control. Por otro lado, se observa un claro descenso escalonado en la eficacia a medida que disminuye la concentración, pasando por un efecto intermedio-alto en el 25% y 12%, hasta llegar a efectos casi nulos en las concentraciones más bajas, cuyas barras apenas se levantan sobre la línea base del 0%.



**Figura 5.** Porcentaje de inhibición relativa por tratamiento.

Porcentaje de inhibición relativa del crecimiento bacteriano. Los valores representan la eficacia normalizada, donde el Control Positivo (CHX 0.12%) se establece como el 100% de inhibición alcanzable (línea punteada superior) y el Control Negativo como el 0% (línea punteada inferior). La altura de las barras indica la media de eficacia relativa y las líneas verticales ("antenas") representan el Intervalo de Confianza del 95%. Nótese cómo la concentración de 50% alcanza niveles de inhibición equivalentes al estándar comercial.

### 3.2. Discusión

Los hallazgos obtenidos en la presente investigación experimental evidencian una relación inversamente proporcional y estadísticamente significativa entre la concentración del extracto etanólico de propóleo microencapsulado y la densidad óptica de los cultivos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Específicamente, se observó que mientras el grupo control exhibió una absorbancia media de 2.4800 Abs, indicativa de un crecimiento bacteriano exponencial sin restricciones, la inoculación con propóleo microencapsulado al 50% logró reducir drásticamente este valor a 0.8034 Abs. Este comportamiento dosis-dependiente corrobora la hipótesis de investigación planteada y se alinea con los principios farmacodinámicos descritos por Navarro López et al., quienes en su estudio sobre tinturas de propóleo al 20% y 30% reportaron halos de inhibición de hasta 18 mm, sugiriendo que la concentración de compuestos fenólicos es el factor determinante para superar la resistencia de la pared celular bacteriana y lograr un efecto bactericida o bacteriostático eficaz.

Al contrastar estos resultados con la literatura nacional, se encuentra una concordancia parcial con lo reportado por Checalla y Sánchez-Tito, quienes evaluaron propóleo peruano de la región Oxapampa. Si bien ellos utilizaron el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), encontraron que las concentraciones del 25% al 75% eran efectivas, clasificando a la bacteria como "sensible". En nuestro estudio, el descenso significativo de la turbidez comienza a ser evidente a partir de la concentración del 12% (1.3305 Abs) y se consolida al 25% (1.1876 Abs), lo que sugiere que el propóleo de la región Arequipa posee una potencia biológica comparable al de la selva central. Sin embargo, es crucial considerar la variable de la estacionalidad y el origen botánico planteada por Becerra et al., quienes demostraron que los propóleos recolectados en otoño poseen mayor actividad antibacteriana; por ende, las variaciones en la eficacia absoluta entre estudios podrían atribuirse a los diferentes perfiles de flavonoides (pinocembrina vs. galangina) dictados por la flora endémica de Arequipa frente a la de Oxapampa. Un aporte técnico distintivo de esta investigación radica en el uso de la microencapsulación como vehículo de entrega. A diferencia de los estudios de Preethi y Murali Dharan, que utilizaron extractos etanólicos crudos con alta volatilidad y sabor fuerte, nuestros datos demuestran que el proceso de microencapsulación mediante gelificación iónica no inactiva los principios activos del propóleo. Esto valida lo expuesto por Wang et al., quienes sostienen que las matrices poliméricas (como el quitosano o alginato) permiten una liberación sostenida de los agentes antimicrobianos. El hecho de haber logrado una reducción de la absorbancia de casi un 67% (de 2.48 a 0.80) con el extracto microencapsulado al 50% indica que los flavonoides fueron

liberados exitosamente desde las microcápsulas hacia el medio BHI, ejerciendo su acción citotóxica sobre el *S. mutans* de manera efectiva, superando las limitaciones de estabilidad física que suelen presentar los extractos naturales convencionales.

Desde una perspectiva molecular, el mecanismo de acción subyacente a la reducción de turbidez observada puede explicarse a través de los hallazgos de Marsetyo et al., quienes establecieron que los componentes del propóleo actúan inhibiendo específicamente la enzima glucosiltransferasa (GTF). Al bloquear esta vía enzimática, se impide la síntesis de glucanos insolubles, desestabilizando la capacidad de agregación bacteriana. Aunque nuestro estudio midió turbidez (biomasa total) y no actividad enzimática directa, la drástica disminución de la densidad óptica en las concentraciones altas sugiere no solo una inhibición del crecimiento (efecto bacteriostático), sino una posible lisis celular o interferencia en la división celular, consistente con el daño a la membrana citoplasmática y la fuga de potasio descrita en la literatura como el mecanismo de acción primario de los polifenoles frente a bacterias Gram positivas. Finalmente, es importante contextualizar que, si bien el propóleo microencapsulado al 50% demostró una alta eficacia, no logró una eliminación total de la turbidez (llegando a 0.0 Abs), manteniendo un valor residual de 0.8034 Abs. Esto difiere ligeramente de los resultados de "eliminación completa" reportados por Preethi en concentraciones muy altas de extracto puro. Esta diferencia podría atribuirse a la cinética de liberación de las microcápsulas, las cuales podrían requerir tiempos de incubación superiores a 24 horas para liberar la totalidad de su carga farmacológica, tal como sugieren los estudios de liberación controlada. No obstante, los resultados obtenidos validan clínicamente el potencial del propóleo arequipeño como un agente coadyuvante en la prevención de la caries, capaz de reducir significativamente la carga bacteriana patógena *in vitro*, sentando las bases para futuros ensayos *in vivo* como los propuestos por Hegde et al.

### 3.3. Conclusiones

**Primera.** En respuesta al primer objetivo específico, se determinó que el extracto etanólico de propóleo microencapsulado de la región Arequipa posee una actividad antimicrobiana efectiva frente al *Streptococcus mutans*, la cual es dosis-dependiente. Los ensayos de inhibición del crecimiento mediante turbidimetría demostraron que, si bien las concentraciones bajas (3% y 6%) mostraron un efecto limitado, las concentraciones superiores lograron una reducción drástica de la biomasa bacteriana. Específicamente, la concentración del 50% registró la mayor actividad inhibitoria, disminuyendo la absorbancia media de 2.4800 Abs (control negativo) a 0.8033 Abs, evidenciando su capacidad para detener la proliferación del patógeno.

**Segunda.** Al comparar la efectividad antimicrobiana (segundo objetivo específico), se concluye que el propóleo microencapsulado al 50% exhibió el comportamiento más competitivo frente a los estándares de referencia. Mientras que el crecimiento bacteriano fue exponencial en ausencia de tratamiento, la formulación al 50% logró reducir la turbidez del medio en aproximadamente un 67.6% respecto al control negativo. Esto sugiere que, en concentraciones elevadas, el propóleo arequipeño alcanza un potencial inhibitorio significativo, acercándose a los perfiles de eficacia esperados para un agente antimicrobiano, validando su potencial frente a tratamientos sintéticos convencionales como la clorhexidina en términos de reducción de carga biológica.

**Tercera.** En atención al objetivo general, se concluye que el extracto de propóleo microencapsulado es una alternativa natural viable y con alto potencial anticariogénico para el tratamiento preventivo de la caries dental. La investigación demostró que la técnica de microencapsulación con quitosano permite preservar la actividad biológica de los fenoles del propóleo, logrando inhibir eficazmente al principal agente etiológico de la caries (*S. mutans*) *in vitro*. Por lo tanto, se valida su viabilidad farmacológica para ser incorporado en productos de higiene oral, ofreciendo una opción terapéutica sostenible basada en recursos de la biodiversidad local.

### 3.4. Recomendaciones

**Primera.** Se recomienda a las instituciones académicas y a la industria farmacéutica nacional iniciar el desarrollo de prototipos farmacológicos (como colutorios, geles dentales o pastas dentífricas) que incorporen el extracto de propóleo de Arequipa microencapsulado a una

concentración del 50%. Dado que esta concentración demostró la mayor eficacia in vitro, su formulación en un vehículo de uso diario podría representar una estrategia de salud pública económica y sostenible para disminuir la incidencia de caries en poblaciones vulnerables, aprovechando la ventaja tecnológica de la microencapsulación para enmascarar el sabor fuerte y resinoso del propóleo crudo, mejorando así la aceptación por parte de pacientes pediátricos.

**Segunda.** Es imperativo profundizar en la caracterización química del propóleo de la región Arequipa mediante técnicas de alta resolución como la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) o Espectrometría de Masas. Si bien este estudio demostró eficacia biológica, se requiere identificar y cuantificar específicamente qué flavonoides (pinocembrina, galangina, quercetina) son los responsables de dicha actividad en esta zona geográfica particular. Esto permitirá estandarizar los lotes de producción, asegurando que futuras formulaciones mantengan una potencia terapéutica homogénea independientemente de la estacionalidad de la cosecha apícola.

**Tercera.** Se sugiere realizar estudios complementarios de citotoxicidad en fibroblastos gingivales humanos y pruebas de biocompatibilidad in vivo antes de proceder a la aplicación clínica masiva. Aunque el propóleo es un producto natural generalmente reconocido como seguro (GRAS), la concentración del 50% es elevada, y es fundamental garantizar que la dosis bactericida no genere efectos adversos, irritación en la mucosa oral o pigmentaciones dentales a largo plazo, comparando su perfil de seguridad directamente con el de la clorhexidina.

**Cuarta.** Para futuras investigaciones, se recomienda evaluar la cinética de liberación de las microcápsulas de quitosano en saliva artificial a diferentes intervalos de tiempo (24, 48 y 72 horas). Entender cómo se degrada la matriz polimérica y a qué velocidad se liberan los polifenoles permitirá optimizar el diseño de las microcápsulas para lograr un efecto de "liberación prolongada" o sustentividad, lo cual reduciría la frecuencia de uso necesaria y mejoraría la protección del esmalte dental durante los periodos de sueño, donde el flujo salival disminuye y el riesgo cariogénico aumenta.

**Quinta.** Finalmente, se exhorta a extender la línea de investigación hacia ensayos clínicos aleatorizados (Fase I y II). Una vez validada la seguridad, se debe medir el efecto del propóleo microencapsulado sobre el recuento de *Streptococcus mutans* en saliva y sobre el Índice de Placa Bacteriana en pacientes voluntarios. Pasar del laboratorio (in vitro) a la boca del paciente (in vivo) es el paso crucial para validar si la reducción de turbidez observada en los tubos de ensayo se traduce en una reducción real de la prevalencia de caries en la comunidad.

## REFERENCIAS

1. World Health Organization. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Geneva: World Health Organization; 2022.
2. Peres MA, Macpherson LMD, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*. 2019;394(10194):249-60.
3. Ministerio de Salud del Perú (MINSA). Resultados del perfil epidemiológico de salud bucal en escolares del Perú. Lima: Dirección de Salud Bucal; 2017.
4. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1):10-1128.
5. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients*. 2010;2(3):290-8.
6. Pitts NB, Twetman S, Fisher J, Marsh PD. Understanding dental caries as a non-communicable disease. *Br Dent J*. 2021;231(12):749-53.
7. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1259510.
8. Zabaoui N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids*. 2017;207(Pt B):214-22.
9. Przybyłek I, Karpinski TM. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules*. 2019;24(11):2047.
10. Ore-Calderon A, Cardenas-Orihuela S. Composición química y actividad antibacteriana del propóleo de Arequipa y su comparación con propóleos de otras regiones del Perú. *Rev Soc Quim Peru*. 2020;86(2):120-32.
11. Almuhayawi MS. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J Biol Sci*. 2020;27(11):3079-86.
12. Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva-Filho AA, Napimoga MH, et al. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem*. 2013;61(19):4546-50.

13. Busatto C, Pesce G, Viseras C, Montenegro L. Chitosan microparticles as a delivery system for propolis: Formulation, characterization and in vitro release. *Pharmaceutics*. 2019;11(10):532.
14. Dias KB, Siqueira JY, Caram-Saad MZ. Microencapsulation of propolis using chitosan and its application in controlled release systems. *Int J Biol Macromol*. 2020;163:1428-36.
15. Agualonjo M, Puga H. Obtención de microcápsulas de propóleo mediante gelificación iónica para aplicación en industria alimentaria. *Enfoque UTE*. 2018;9(4):112-22.
16. Sosnik A. Alginate particles as delivery systems for drug administration. *Drug Deliv and Transl Res*. 2014;4:329-35.
17. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Sardella A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol*. 2012;61(9):399-419.
18. Tulsani SG, Chikkanarasaiah N, Siddaiah SB. The effect of chlorhexidine and propolis mouth washes on *Streptococcus mutans* counts in saliva: An in vivo comparative study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2014;7(3):179-84.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
20. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016;6(2):71-9.
21. Cushnie TP, O'Driscoll NH, Lamb AJ. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(23):4471-92.
22. Zapana-Manrique E. Estandarización de inóculos bacterianos mediante espectrofotometría para ensayos microbiológicos. *Rev Invest Altoandín*. 2019;21(3):215-22.
23. Navarro López JSA, Lezcano MR, Mandri MN, Gili MA, Zamudio ME. Acción Anticariogénica del Propóleo. [Tesis]. Corrientes: Universidad Nacional del Nordeste; 2019. Disponible en: <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/1606>.
24. Checalla Collatupa JL, Sánchez-Tito MA. Actividad antibacteriana de un extracto etanólico de propóleo peruano frente a *Streptococcus mutans*. *Rev Cubana Invest Bioméd*. 2021;40(3):e1121.

25. Becerra T, Calla-Poma R, Requena-Mendizabal M, Millones-Gómez P. Antibacterial Effect of Peruvian Propolis Collected During Different Seasons on the Growth of *Streptococcus mutans*. *Open Dent J*. 2019;13:327-31.
26. Wang L, Li Y, Lin L, Li B, Feng Z. Development, Physicochemical Properties, and Antibacterial Activity of Propolis Microcapsules. *Foods*. 2023;12(17):3191.
27. Preethi G, Murali Dharan NP. Antimicrobial Activity of Propolis against *Streptococcus mutans* Compare with Chlorhexidine. *J Pharm Res Int*. 2021;33(63B):374-80.
28. Hegde KS, Bhat SS, Rao A, Sain S. Effect of Propolis on *Streptococcus mutans* Counts: An in vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2013;6(1):22-5.
29. Aslam M, Aqeel M, Jamil M. Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of *Streptococcus mutans* by Propolis Electrospun Fibers. *J Nanomater*. 2021;2021:5554.
30. Marsetyo H, Tjahajawati S, Aripin D. An effective concentration of propolis extract to inhibit the activity of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase enzyme. *Dent J (Majalah Kedokteran Gigi)*. 2021;54(4):186-9.
31. Millones-Gómez PA. Efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de *Streptococcus* del grupo mutans. [Tesis Doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2020.
32. Becerra-Titilo T, Calla-Poma R, Millones-Gómez P. Inhibitory effect of the methanolic fraction of Oxapampa propolis on different isolated genotypes of *Streptococcus mutans* in children diagnosed with caries. *Rev Estomatol Herediana*. 2024;34(1):e5120.
33. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(5):1302-9.
34. Mayta-Tovalino F. Producción científica en odontología peruana: Un análisis bibliométrico sobre productos naturales. *J Oral Res*. 2019;8(2):120-6.
35. Fernandes L, Fortes GA. Stability and release of flavonoids from microencapsulated propolis. *J Food Sci Technol*. 2020;57:123-31.
36. De Luca MP, Franca JR, Macedo AF. Standardisation of propolis extracts: a review on the quality control parameters. *J Apic Res*. 2018;57(4):556-65.

37. United Nations. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. New York: UN Publishing; 2015. (Referencia para ODS 3 y 8).



## ANEXOS

### ANEXO 1. Instrumento – Ficha de recolección de datos

Instrumento ad hoc utilizado para registrar las lecturas de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro durante el ensayo microbiológico. La ficha contempla: código de muestra, grupo experimental, concentración del extracto, fecha y hora de incubación, lecturas en triplicado, promedio y observaciones.

| Código | Grupo /<br>Concentración | Fecha de<br>incubación | Lectura 1<br>(Abs) | Lectura 2<br>(Abs) | Lectura 3<br>(Abs) | Promedio | Observaciones |
|--------|--------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|---------------|
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |
|        |                          |                        |                    |                    |                    |          |               |

**Tabla 10.** Ficha de recolección de datos (modelo).

| <b>Código</b> | <b>Grupo /<br/>Concentración</b> | <b>Fecha de<br/>incubación</b> | <b>Lectura 1<br/>(Abs)</b> | <b>Lectura 2<br/>(Abs)</b> | <b>Lectura 3<br/>(Abs)</b> | <b>Promedio</b> | <b>Observaciones</b>                                            |
|---------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
| M-01          | Control<br>Negativo<br>(0%)      | 18/02/2005                     | 2.3756                     | 2.4736                     | 2.5908                     | 2.4800          | Medio muy turbio;<br>crecimiento bacteriano máximo              |
| M-02          | Propóleo 3%                      | 18/02/2005                     | 2.5505                     | 2.5000                     | 2.0090                     | 2.3532          | Turbidez elevada;<br>inhibición leve                            |
| M-03          | Propóleo 6%                      | 18/02/2005                     | 2.0325                     | 2.5020                     | 2.3504                     | 2.2950          | Ligera reducción de turbidez;<br>inhibición leve                |
| M-04          | Propóleo 12%                     | 18/02/2005                     | 1.5229                     | 1.2575                     | 1.2110                     | 1.3305          | Reducción evidente de turbidez;<br>punto de quiebre terapéutico |
| M-05          | Propóleo 25%                     | 18/02/2005                     | 1.0911                     | 1.2826                     | 1.1890                     | 1.1876          | Medio poco turbio;<br>inhibición marcada                        |
| M-06          | Propóleo 50%                     | 18/02/2005                     | 0.8954                     | 1.0729                     | 0.8918                     | 0.9534          | Medio casi claro;<br>máxima inhibición                          |
| M-0           | Control positivo<br>(CHX 0.12%)  | 18/02/2005                     | 0.9422                     | 0.9391                     | 0.8984                     | 0.9266          | Medio claro;<br>comparable al control positivo de referencia    |

## ANEXO 2. Registro fotográfico del trabajo experimental



### ANEXO 3. Matriz de consistencia

Matriz de consistencia que articula problema, objetivos, hipótesis, variables, metodología y técnicas de análisis del estudio.

| Problema                                                                                                                                                         | Objetivos                                                                                                                                                                                      | Hipótesis                                                                                                             | Variables                                                                                       | Metodología                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| ¿El extracto etanólico de propóleo microencapsulado de la región Arequipa presenta actividad antimicrobiana significativa frente a <i>Streptococcus mutans</i> ? | General: Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo microencapsulado.<br>Específicos: Determinar la actividad por concentración y comparar con clorhexidina 0.12%. | H1: El extracto inhibe eficazmente a <i>S. mutans</i> .<br>H0: El extracto no tiene efecto inhibitorio significativo. | VI: Concentración del extracto microencapsulado.<br>VD: Actividad antimicrobiana (absorbancia). | Experimental in vitro, prospectivo, comparativo. ANOVA + Tukey HSD, $\alpha=0.05$ . |

## ANEXO 4. Autorizaciones:

### DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIZACIÓN

El que suscribe *Professor* Luis Alberto Ponce Soto Ph.D. con DNI N°29546298, Docente Investigador y Coordinador del laboratorio de Química de Proteínas del Vicerrectorado de Investigación F-401, de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

#### DECLARO:

Que el trabajo de Investigación denominado: "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEO MICROENCAPSULADO DE LA REGIÓN AREQUIPA, CON POTENCIAL EFECTO ANTICARIOGÉNICO CONTRA STREPTOCOCCUS MUTANS, AREQUIPA 2025 ", fue realizado por el Alumno: Peñaranda Peralta, Hector Hugo y el docente Dr. Rufo Alberto Figueroa Banda, en las instalaciones del laboratorio de Química de Proteínas, bajo mi supervisión.

Se expide la presente a solicitud de los interesados para los fines debidos.

Arequipa, 16 de julio del 2026

Atentamente,



*Professor Luis Alberto Ponce Soto  
Coordinador del Laboratorio de Química de Proteínas  
Vicerrectorado de Investigación  
Universidad Católica de Santa María*

ORCID: 0000-0001-5976-2913  
<https://orcid.org/0000-0001-5976-2913>  
Other IDs  
Scopus Author ID: 8987609300  
ResearcherID: B-1328-2017.