



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

EFECTO ANTIBACTERIANO DE  
PROPÓLEOS PERUANOS Y ACCIÓN DE  
UNA FRACCIÓN METANÓLICA SOBRE  
UN BIOFILM IN VITRO DE  
*STREPTOCOCCUS GORDONII* Y  
*FUSOBACTERIUM NUCLEATUM*

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
DOCTOR EN ESTOMATOLOGÍA

PABLO ALEJANDRO MILLONES GÓMEZ

LIMA – PERÚ

2021



**ASESORA:**

**Dra. Lidia Yileng Tay Chu Jon**

Departamento Académico de Clínica Estomatológica - UPCH

**CO-ASESORAS:**

**Dra. Patricia Sheen Cortavarría**

Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares - UPCH

**Msc. Dora Maurtua Torres**

Departamento de Bacteriología – UPCH

**Dra. Ingrit Elida Collantes Díaz**

Facultad de Ciencias – UNI

**JURADO EXAMINADOR**

|  |                   |
|--|-------------------|
| <b>DR. ALFONSO ZA VALETA MARTINEZ-VARGAS</b> | <b>PRESIDENTE</b> |
| <b>DRA. MARIA CRISTINA IKEDA ARTACHO</b>     | <b>SECRETARIA</b> |
| <b>DR. ABRAHAM MENESES LOPEZ</b>             | <b>VOCAL</b>      |
| <b>DRA. ROSARIO ELENA ROJAS DURAN</b>        | <b>VOCAL</b>      |

## **Dedicatoria.**

A mi madre, que desde la eternidad continúa guiando cada paso que  
doy en esta vida.

A Yhovanna y Daniela, mis amadas esposa e hija, mi fuerza y motivo  
de seguir superándome cada día.

A mi padre José Pablo y mis hermanos Pavel y Pepe, por ser el apoyo  
y los cómplices de cada nuevo reto en mi vida

## **Agradecimientos.**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC)

Federación Peruana de Apicultores

Sociedad Latinoamericana de Investigación en Abejas

CIDICS, Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Aguas

Calientes

Microscope Core, University of California San Diego

LID, Universidad Peruana Cayetano Heredia

LIBIPMET, Universidad Nacional De Ingeniería

A mis compañeros de posgrado.

## **Fuentes de Financiamiento.**

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC)

Convenio N° 163-2016-UPCH

## INDICE DE CONTENIDO

|                                 | Pág. |
|---------------------------------|------|
| I. Introducción                 | 1    |
| II. Materiales y métodos        | 9    |
| III. Resultados                 | 26   |
| IV. Discusión                   | 38   |
| V. Conclusiones                 | 43   |
| VI. Recomendaciones             | 45   |
| VII. Referencias Bibliográficas | 46   |
| VIII. Anexos                    |      |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Tabla 1.</b> Listado de propóleos peruanos   | 9           |
| <b>Tabla 2.</b> Efecto antibacteriano de extractos brutos orgánicos de 13 propóleos peruanos sobre cepas de <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™.   | 30          |
| <b>Tabla 3.</b> Efecto antibacteriano de las particiones de extractos brutos orgánicos de propóleos peruanos que mostraron actividad antibacteriana sobre cepas <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™. | 31          |
| <b>Tabla 4.</b> Citotoxicidad de las particiones de propóleo con mayor efecto antibacteriano sobre cepas <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™ en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014.                | 32          |
| <b>Tabla 5.</b> Efecto antibacteriano de las fracciones seleccionadas de propóleos sobre cepas <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™.  | 33          |
| <b>Tabla 6.</b> Concentración mínima inhibitoria de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™.   | 34          |

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Tabla 7.</b> | Citotoxicidad de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™ en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014  | 35 |
| <b>Tabla 8.</b> | Efecto sobre el espesor del biofilm mediante microscopía confocal de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™ y no toxica en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014  | 36 |
| <b>Tabla 9.</b> | Evaluación de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas <i>S. gordonii</i> ATCC® 51656™ y <i>F. nucleatum</i> ATCC® 10953™ en la cantidad de bacterias mediante la cuantificación del número de copias de los genes <i>srtA</i> de <i>S. gordonii</i> y <i>radD</i> de <i>F. nucleatum</i> en el biofilm a través de PCR | 37 |

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

|                       |   |   |
|-----------------------|---|---|
| <b>E.B.O</b>          | : | Extracto bruto orgánico                                 |
| <b>ATCC</b>           | : | American Type Culture Collection                        |
| <b>H<sub>2</sub></b>  | : | Hidrógeno molecular                                     |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | : | Dióxido de carbono                                      |
| <b>N<sub>2</sub></b>  | : | Nitrógeno molecular                                     |
| <b>MIC</b>            | : | Concentración mínima inhibitoria                        |
| <b>TA</b>             | : | Temperatura ambiente                                    |
| <b>μl</b>             | : | Microlitros   |
| <b>mL</b>             | : | Mililitro   |
| <b>BHI</b>            | : | Brain Heart Infusion                                    |
| <b>TSA</b>            | : | Trypto-Casein Soy Agar                                  |
| <b>PBS</b>            | : | Phosphate buffered saline                               |
| <b>PFA</b>            | : | Paraformaldehido  |
| <b>μm</b>             | : | Micrómetro  |
| <b>mm</b>             | : | Milímetro   |
| <b>MTT</b>            | : | 3-(4.5-dimeltiazol-2-yl) -2.5-difeniltetrazolio bromuro |
| <b>PCR</b>            | : | Reacción en cadena de la polimerasa                     |
| <b>DMSO</b>           | : | Dimetilsulfóxido  |
| <b>HGF-1</b>          | : | Fibroblastos gingivales humanos                         |
| <b>DME</b>            | : | Diclorometano   |

|                    |   |                                    |
|--------------------|---|------------------------------------|
| DMEP               | : | Diclorometano de propóleo          |
| CHX                | : | Clorhexidina                       |
| D-MEM              | : | Dulbecco's Modified Eagle's        |
| NaCl               | : | Cloruro de Sodio                   |
| UV                 | : | ultravioleta                       |
| EDTA               | : | Ácido etilendiaminotetraacético    |
| SDS                | : | Laurilsulfato sódico               |
| CTAB               | : | Bromuro de hexadeciltrimetilamonio |
| DAPI               | : | 4', 6-diamidino-2-fenilindol       |
| CHCl <sub>3</sub>  | : | Cloroformo                         |
| BuOH               | : | 1-butanol                          |
| RCHCl <sub>3</sub> | : | Residuo Clorofórmico               |
| RBuOH              | : | Residuo butanólico                 |
| RH <sub>2</sub> O  | : | Residuo acuoso                     |

## RESUMEN

**Objetivo:** El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de *Streptococcus gordonii* ATCC® 51656™ y *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 10953™.

**Materiales y métodos:** Mediante experimentos en secuencia se recolectaron y evaluaron 13 propóleos del ande peruano midiendo su efecto antibacteriano sobre cepas de *S. gordonii* y *F. nucleatum* a través de halos de inhibición. Se usó como controles a la Clorhexidina y DMSO. Se evaluaron los extractos brutos orgánicos, particiones y fracciones de propóleos; además se evaluó la citotoxicidad de los propóleos sobre líneas celulares HGF-1-ATCC CRL-2014 mediante técnicas colorimétricas de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) y densidad óptica. Finalmente se evaluó el efecto de los propóleos sobre el biofilm mediante microscopia confocal y PCR.

**Resultados:** Se encontró que la muestra de propóleo de Oxapampa presentó efecto antibacteriano sobre ambas cepas estudiadas tanto en los extractos brutos, particiones clorofórmicas, butanólicos y fracción metanólica. La concentración mínima inhibitoria de 0.78 mg/mL de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa no fue tóxica sobre fibroblastos gingivales. Las concentraciones de 0.78 mg/mL y 1.563 mg/mL. de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleos de Oxapampa presentaron efecto sobre el espesor del biofilm y el número de copias del gen *srtA* de *S. gordonii* y gen *radD* de *F. nucleatum* a las 120 horas,

**Conclusión:** De los 13 propóleos peruanos, se encontró que la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa presentó efecto antibacteriano

sobre *S. gordonii* y *F. nucleatum* y efecto sobre el espesor del biofilm creado in vitro.

**Palabras claves:** Biofilm, antibacteriano, uso terapéutico, productos naturales

## ABSTRACT

**Objective:** The objective of the present study was to evaluate the antibacterial effect of Peruvian propolis and the action of a methanolic fraction on an in vitro biofilm of *Streptococcus gordonii* ATCC® 51656™ and *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 10953™.

**Materials and Methods:** Through sequence experiments, 13 propolis from the Peruvian Andes were collected and evaluated by measuring their antibacterial effect on *S. gordonii* and *F. nucleatum* strains through inhibition halos. Chlorhexidine and DMSO were used as controls. Organic raw extracts, partitions and propolis fractions were evaluated; besides, it was evaluated propolis cytotoxicity on HGF-1-ATCC CRL-2014 cell lines through colorimetric techniques of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and optical density. Finally, the effect of propolis on biofilm was evaluated by confocal microscopy and PCR.

**Results:** It was found that Oxapampa's propolis sample presented antibacterial effect on both strains studied, in raw extracts, chloroformic partitions, butanolic and methanolic fraction. The minimum inhibitory concentration of 0.78 mg/mL of the methanolic fraction of the chloroformic residue of Oxapampa propolis was not toxic on gingival fibroblasts. Concentrations of 0.78 mg/mL and 1,563 mg/mL of the methanolic fraction of the chloroformic residue of propolis from Oxapampa influenced biofilm thickness and copy number of the *srtA* gene of *S. gordonii* and *radD* gene of *F. nucleatum* at 120 hours,

**Conclusion:** Of the 13 Peruvian propolis, it was found that the methanolic fraction of the chloroformic residue of Oxapampa propolis presented an antibacterial effect

on *S. gordonii* and *F. nucleatum* and effect on the thickness of the biofilm created in vitro.

**Keywords:** Biofilm, antibacterial, therapeutic use, natural products

## I. INTRODUCCIÓN

El papel del microbioma oral en la patogénesis de la enfermedad ha sido ampliamente explorado durante un largo período. Recientemente, se introdujo la hipótesis de la placa ecológica, que sugiere que la acumulación de placa dental alrededor del margen gingival puede proporcionar tensiones ecológicas que favorecen la proliferación de bacterias Gramnegativas anaeróbicas, y finalmente causar una respuesta

destruktiva del tejido. Estos cambios ecológicos en la composición de la microbiota subgingival, es decir, la proliferación de diferentes anaerobios Gram-negativos sobre especies Gram-positivas facultativas en la bolsa periodontal, está bien documentado que están asociados con el desarrollo y la progresión de periodontitis.<sup>1</sup>

Se ha descubierto que *Fusobacterium nucleatum*<sup>1,2</sup> y *Streptococcus gordonii*.<sup>2</sup> son algunas de las bacterias más importantes relacionadas con la enfermedad periodontal y periimplantaria en los pacientes, principalmente en los fumadores.<sup>3</sup>

La comunidad científica ha hecho un gran esfuerzo por descubrir nuevas entidades antimicrobianas capaces de perturbar las complejas estructuras de los biofilm subgingivales. Una de las principales fuentes de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana son los productos de origen natural.<sup>4-6</sup> La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos ha cobrado impulso, en particular debido al aumento de

las tasas de resistencia a los antibióticos de los patógenos periodontales.<sup>7-8</sup> Por ejemplo, un estudio clínico realizado en los Estados Unidos reveló altas tasas de pacientes con patógenos periodontales subgingivales resistentes al menos a uno de los siguientes antibióticos: amoxicilina, clindamicina, doxiciclina y metronidazol.<sup>9</sup>

Socransky et al.<sup>10</sup> encontraron que la microbiota subgingival puede clasificarse en diferentes complejos en función de la asociación de la especie microbiana con sitios sanos o enfermos. Los complejos bacterianos se distinguen por distintos colores según su virulencia o su efecto de transición entre la salud y la enfermedad. Así, el complejo amarillo incluye biofilm formadas por varios tipos de *Streptococcus spp.*; el complejo púrpura corresponde principalmente a *Actinomyces odontolyticus* y *Veillonella parvula*, que inician la formación de biofilm subgingivales y permiten una mayor colonización por *Capnocytophaga*, *Eikenella* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo a. Dichas biofilm se consideran sanas y no causan enfermedades a menos que se produzca un cambio específico en la composición microbiana.

Si se dejan intactas, las biofilm crean condiciones que pueden favorecer la colonización de las especies del complejo naranja, a saber: *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Prevotella*, *Parvimonas* y algunos *Streptococcus spp.* (por ejemplo, el grupo *S. constellatus*). El complejo naranja está asociado con la transición salud-enfermedad debido al cambio en las condiciones ambientales que favorecen la colonización por *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y

*Treponema denticola*, que son especies incluidas en el complejo rojo y se consideran los principales patógenos de la enfermedad periodontal.<sup>10</sup>

El propóleo es una sustancia resinosa compuesta por una mezcla de diferentes partes de plantas y moléculas secretadas por las abejas.<sup>11,12</sup> Los propóleos se han considerado una fuente prometedora de moléculas bioactivas con propiedades farmacológicas, entre las que se incluyen su característica antimicrobiana,<sup>13-17</sup> actividad antiinflamatoria,<sup>18,19</sup> antioxidante y antiparasitaria.<sup>17</sup> Los propóleos pueden tener varios orígenes geográficos.<sup>20-22</sup> No obstante, a pesar que pueden compartir características físicas similares, la composición química de las muestras de propóleos de estos lugares puede no ser la misma debido a que depende del lugar, el tiempo, método de recolección y los distintos orígenes botánicos.<sup>23</sup>

La composición química del propóleo está estrechamente relacionada con las resinas y bálsamos de las fuentes vegetales que se utilizan para producirla. Se han identificado más de 300 componentes químicos de propóleos.<sup>24,25</sup> Los principales grupos de compuestos químicos que se encuentran presentes en los propóleos, son las ceras, los polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides) y los terpenoides, de las cuales estos dos últimos se consideran los más activos.<sup>26-28</sup> El grupo de los flavonoides incluye, *pinocembrina*, *apigenina*, *galangina*, *kaempferol*, *quercetina*, *pinostrobina* entre otros. Otro grupo crítico de compuestos de propóleos son los ácidos aromáticos, entre los cuales los más frecuentes son los ácidos ferúlicos, cinámico, cafeico, benzoico, salicílico y p-cumárico.<sup>29-33</sup>

Existen algunos trabajos de investigación que han demostrado el efecto de los propóleos sobre biofilms de bacterias orales, así: Veloz et al.<sup>34</sup> realizaron un estudio cuyo propósito fue comparar algunas propiedades biológicas como la actividad antimicrobiana y antibiofilm de los compuestos individuales y la mezcla de estos compuestos de propóleos chilenos sobre cultivos de *S. mutans*. La concentración mínima inhibitoria se determinó por el método de dilución en serie y el efecto sobre el espesor del biofilm de *S. mutans* fue medido por microscopía confocal. Estos resultados sugieren que los polifenoles *pinocembrina* y *apigenina* exhiben actividad antimicrobiana contra el *S. mutans* en bajas concentraciones.

Martins et al.<sup>35</sup> evaluaron in vitro la actividad antibacteriana, el efecto antibiótico y el potencial citotóxico de los enjuagues bucales que contienen propóleos rojos brasileños. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibidoras y bactericidas (CMI y CMB) contra *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* y *L. casei* para los enjuagues bucales. Se formó una biopelícula cariogénica con las bacterias antes mencionadas sobre discos de membrana de celulosa (N = 30, 13 mm), que se sometieron durante 1 min a los enjuagues bucales. Se midió la viabilidad bacteriana y la producción de polisacáridos extracelulares (EPS). También se evaluó el potencial citotóxico de los enjuagues bucales. Los valores de MIC y MBC de los enjuagues bucales oscilaron entre 7,44 y 29,76 mg/mL presentando una mejor acción *contra S. salivarius*. Los enjuagues bucales de propóleos rojos mostraron un 44% de células viables después de 1 min de contacto con los fibroblastos. Se concluyó que el extracto rojo de propóleo mostró actividad antibacteriana contra

*Streptococcus spp.* y *L. casei*, y una citotoxicidad y efecto antibiofilm similar a la clorhexidina.

Veloz et al.<sup>36</sup> evaluaron métodos alternativos para determinar el efecto del propóleo chileno en la formación de biofilm y la actividad metabólica del *Streptococcus mutans*. La formación de biofilm fue evaluada mediante el uso del cristal de violeta y microscopía confocal. La actividad metabólica de la biopelícula fue evaluada por el MTT y por análisis de citometría de flujo. Los resultados sugieren que los métodos de tinción presentaron una gran variabilidad para evaluar el efecto del propóleo en la formación de biofilm y la actividad metabólica. La citometría de flujo y la microscopía confocal permitieron obtener resultados más precisos en comparación con las metodologías tradicionales. Por tanto, se recomendó el uso de la citometría de flujo y la microscopía confocal para evaluar las propiedades antimicrobianas del propóleos en el *Streptococcus mutans*.

Utispan et al.<sup>38</sup> evaluaron los efectos antimicrobianos del propóleos sobre biofilms de *Streptococcus mutans*. Se prepararon y analizaron extractos de diclorometano (DME) de propóleos (DMEP) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase reversa. Se compararon los efectos de crecimiento antibacteriano y antibiofilm del DMEP en *S. mutans* con los de la *apigenina*. Se investigaron los efectos del DMEP y la *apigenina* en la expresión de la glucosiltransferasa (gtf) B en el *S. mutans* mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. En los experimentos se utilizó la clorhexidina (CHX) como control positivo. El DMEP

y la apigenina inhibieron significativamente el crecimiento de *S. mutans* (IC50 = 43,5 y 17,36 mg/mL, respectivamente). El DMEP y la *apigenina* también mostraron efectos antiadherentes en *S. mutans*, como lo demuestra la reducción de la formación de biofilm. Además, se observó una inhibición significativa de la expresión de la *gtfB* en *S mutans* tratados con DMEP y *apigenina*.

La diversidad en la composición química que posee el propóleo es una ventaja como agente antibacteriano.<sup>39-49</sup> Sin embargo, a pesar del esfuerzo por investigar sus propiedades farmacológicas no existen estudios de propóleos peruanos que evalúen su acción sobre bacterias presentes en biofilms periodontales.

Por consiguiente, planteamos la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de *Streptococcus gordonii* ATCC® 51656™ y *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 10953™?

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de *Streptococcus gordonii* ATCC® 51656™ y *Fusobacterium nucleatum* ATCC® 10953™.

### **Objetivos Específicos:**

1. Evaluar el efecto antibacteriano de los extractos brutos orgánicos de 13 propóleos peruanos sobre cepas de *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.
2. Evaluar el efecto antibacteriano de las particiones de extractos brutos orgánicos de propóleos peruanos que mostraron actividad antibacteriana sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.
3. Evaluar la citotoxicidad de las particiones de propóleo con mayor efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014.
4. Evaluar el efecto antibacteriano de las fracciones seleccionadas de propóleos sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.
5. Determinar la concentración mínima inhibitoria de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.
6. Evaluar la citotoxicidad de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014.
7. Evaluar el efecto sobre el espesor del biofilm mediante microscopia confocal de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ y no toxica en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014

8. Evaluar el efecto de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ en la cantidad de bacterias mediante la cuantificación del número de copias de los genes *srtA* de *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *radD* de *F. nucleatum* ATCC® 10953™ en el biofilm a través de PCR.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño del estudio

El presente estudio es de tipo experimental secuencial, in vitro, longitudinal y doble ciego (investigadores y estadístico).

Este diseño permitió en cada experimento obtener resultados y conclusiones para plantear la siguiente etapa de experimentación<sup>50</sup> en base a criterios de decisión.

### Técnicas y/o procedimientos

#### Recolección de los Propóleos

Las muestras de propóleos fueron recolectadas de apiarios fijos y con flora silvestre alrededor de la colmena. Todas ellas obtenidas de 13 regiones andinas del Perú, detalladas a continuación:

*Tabla 1. Listado de propóleos andinos peruanos*

| Código de muestra | Lugar de Recolección       | Ubicación geográfica      |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|
| A                 | Yanasara, La Libertad      | 10°33'17.8"S 75°25'01.6"W |
| B                 | Vitor, Arequipa            | 16°28'49.6"S 71°50'40.7"W |
| D                 | Shiymay, Huánuco           | 9°57'36.1"S 76°09'29.9"W  |
| E                 | Chontabamba, Pasco         | 10°36'04.7"S 75°26'28.7"W |
| F                 | San Miguel de Aco, Ancash. | 9°22'39.8"S 77°32'33.5"W  |
| G                 | Saylla, Cusco              | 13°33'34.7"S 71°50'34.8"W |
| A*                | Chanchamayo, Junín         | 11°08'43.5"S 75°24'26.0"W |
| B*                | Caraz, Ancash              | 9°03'06.9"S 77°49'02.6"W  |
| C*                | Marcará, Ancash            | 9°19'37.4"S 77°36'27.9"W  |

|    |                   |                           |
|----|-------------------|---------------------------|
| D* | La merced, Junín. | 11°04'46.4"S 75°20'28.6"W |
| E* | Yura, Arequipa    | 16°14'49.4"S 71°42'17.2"W |
| F* | Oxapampa, Pasco   | 10°39'01.6"S 75°23'14.7"W |
| G* | Siguas, Arequipa  | 16°20'39.2"S 72°07'38.3"W |

---

El proceso de recolección fue realizado mediante raspado de las cajas con espátula de plástico con bisel y colocados en recipientes de vidrio herméticos cubiertos con bolsas de plástico oscuro<sup>18</sup> hasta su entrega en el Laboratorio de Investigación de Biopolímeros y Metalofármacos (LIBIPMET), de la Universidad Nacional de Ingeniería. Todos los propóleos fueron enmascarados por una persona ajena al estudio y rotulados con letras, hasta luego de terminado el procesamiento de datos. Posteriormente fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C, hasta su procesamiento.

#### **Preparación de los Extractos Brutos Orgánicos de los propóleos:**

Las muestras fueron retiradas de refrigeración y se esperó 2 horas para que lleguen a temperatura ambiente, luego se procedió a cortarlo en finas láminas para posteriormente macerarlos en etanol grado P.A. (para análisis) con un volumen de 100 mL por cada 10 gramos de muestra de propóleo dejándolo en reposo por 24 horas. Luego se procedió a filtrar el macerado usando un embudo de vidrio de 20 cm de diámetro con algodón estéril y se recolectó la muestra en un refractario de vidrio que fue llevado a una campana de extracción para evaporación del etanol (hasta formación de una pasta), el agua que se acumuló en la muestra fue liofilizada. La maceración fue realizada dos veces más hasta que se observó que las muestras fueron decoloradas. Finalmente, se guardaron en recipientes de vidrios cubiertos con papel de aluminio para evitar su degradación.<sup>18</sup>

### **Preparación de las particiones líquido-líquido de los propóleos:**

El extracto bruto orgánico (E.B.O) fue solubilizado con una mezcla de cloroformo-metanol 4:1 v/v respectivamente, fue necesario aproximadamente 50 mL de la mezcla para conseguir solubilizar completamente la muestra. Para proceder con la partición líquido-líquido se utilizó una columna de vidrio con llave de teflon (3 cm diámetro interno y 100 cm de largo), se procedió a armar la columna de separación el cual estaba sostenida en un soporte universal con dos pinzas con nuez para que este fijo y seguro. Posteriormente a la columna de separación armada, se agregó 30 mL de agua ultrapura y posteriormente el propóleo solubilizado, enseguida fue añadido aproximadamente 250 mL de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ). Aquí se pudo observar la formación de dos fases (la fase superior es la acuosa la fase inferior es la fase orgánica, clorofórmica). Se dejó reposar por seis horas hasta que ambas fases estén translucidas y posteriormente se abrió la llave de la columna y se recolectó en un vaso de 500 mL y fue llevado a la campana para evaporación del solvente, enseguida fue añadido 250 mL de  $\text{CHCl}_3$  y se repitió el procedimiento anterior, las fases clorofórmicas fueron reunidas en el mismo vaso. La fase acuosa fue recuperada en un vaso de 100 mL. Ambas fases recolectadas fueron llevadas a la campana de extracción para evaporación del cloroformo. <sup>56-58</sup>

En la misma columna que se usó previamente se agregó 300 mL de 1-butanol ( $\text{BuOH}$ ) y posteriormente la fase acuosa obtenida anteriormente fue vertida dentro de la columna. Se observó la formación de dos fases (inferior acuosa y superior butanólica), se dejó reposar alrededor de 3 horas hasta que ambas fases queden totalmente translucidas. Luego ambas fases son separadas y recolectadas en vasos

de 500 mL (fase butanólica) y 100 mL (fase acuosa), inmediatamente fueron llevadas a la campana de extracción para la evaporación del BuOH, una vez formado una pasta se añadió agua, fue congelada a -70 °C por 24 horas y liofilizada dos veces. La fase acuosa fue congelada a -70 °C por 24 horas (en ultracongeladora), luego fue liofilizada la muestra en un liofilizador LABCONCO 2.5L a una presión de 0.018 mbar y -54 °C. Finalmente se obtuvo por cada muestra de propóleo 3 residuos: residuo clorofórmico (RCHCl<sub>3</sub>), residuo butanólico (RBUOH) y residuo acuoso (RH<sub>2</sub>O).<sup>59,60</sup>

**Obtención de las fracciones de los propóleos a partir del residuo clorofórmico (RCHCl<sub>3</sub>):**

Luego que fue obtenida las particiones de los propóleos se realizó el fraccionamiento del RCHCl<sub>3</sub> utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil los solventes el éter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) y metanol (MeOH).

El RCHCl<sub>3</sub> del propóleo fue solubilizado con éter de petróleo. Fue realizado la cromatografía en columna abierta con fase estacionaria Sephadex LH-20 (100 gr) en éter de petróleo. La muestra solubilizada fue añadida en la columna y eluida con EP (450 mL), seguida de DCM (350 mL) y finalmente con MeOH (500 mL), fue esta manera que se obtuvo las fracciones de fracción de éter de petróleo (FEP), fracción de diclorometano (FDCM) y la fracción metanólica (FMeOH). Las fracciones obtenidas fueron secadas en una campana de extracción.<sup>60,61</sup>

Finalmente, las tres fracciones secas fueron llevadas al laboratorio de Bacteriología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para continuar con los ensayos de

sensibilidad antimicrobiana.

### **Cepas Bacterianas:**

Se emplearon cepas de *S. gordonii* (ATCC® 51656™) y *F. nucleatum* (ATCC® 10953™). Los microorganismos fueron importados directamente de la American Type Culture Collection (ATCC) USA, y cultivados en el Laboratorio de Bacteriología de los laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia siguiendo las instrucciones del fabricante.<sup>62</sup>

### **Evaluación de la actividad antibacteriana:**

Para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana se aplicó la técnica de disco difusión.

Medio de cultivo: Se prepararon placas conteniendo Agar Trypticase soya (TSA) para *S. gordonii* ATCC® 51656™ y TSA suplementado con un 5% de sangre de carnero, hemina (5 mg/L) y menadiona (1 mg/L) para *F. nucleatum* ATCC® 10953™, las cuales fueron controladas por 24 horas para comprobar la esterilidad.<sup>63</sup>

Preparación del inóculo: las dos bacterias fueron cultivadas en caldo de Trypticase de soya en condiciones de anaeróbicas (10% H<sub>2</sub>, 10% de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> en equilibrio) a 37°C por 24 horas y luego se llevó a la escala de Mac Farland de 0,5.<sup>63</sup>

Enfrentamiento: Se realizó embebiendo un hisopo con el inóculo anteriormente preparado, luego se procedió a sembrar en la superficie del agar por cuatro veces,

se dejó reposar por 5 minutos y luego se colocó los discos de papel de filtro (Whatman 3) de 6 mm de diámetro, impregnados con 10 µL de cada uno de los extractos de Propóleo, por separado. Este procedimiento fue repetido 4 veces, obteniéndose finalmente, placas para cada uno de los extractos (EBO, particiones y fracciones). Se empleó como control positivo una solución de clorhexidina a 0.12% y como control negativo la solución de DMSO y agua Milli-Q (1:1). Posteriormente las muestras de propóleos, controles positivos y negativos fueron incubados a 37 °C por 48 horas, en condiciones de anaerobiosis. La lectura de resultados a través de los halos de inhibición en milímetros (mm) fue realizada mediante un vernier calibrado marca Truper.<sup>63</sup>

***Criterios de decisión:*** Luego de evaluar los extractos brutos orgánicos de los 13 propóleos se decidió realizar las particiones, solo en aquellos extractos que hayan presentado halo de inhibición sobre ambas cepas estudiadas y continuar su evaluación citotóxica frente a fibroblastos gingivales humanos.

#### **Evaluación del efecto citotóxico de Propóleo sobre la línea celular (HGF-1 - ATCC CRL-2014).**

La evaluación de la citotoxicidad a través del porcentaje de viabilidad celular fue desarrollada en el laboratorio de odontología del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. El efecto citotóxico de propóleo sobre la línea celular HGF-1 (CRL 2014 ATCC, fibroblastos de tejido gingival de Homo sapiens human normal) se realizó adaptando la metodología de viabilidad celular en microplaca con MTT.<sup>64,65</sup>

Se partió de cultivos celulares confluentes de HGF-1 (80-100%) que se encontraban contenidos en frascos de 25 cm<sup>3</sup>, se descartó el medio utilizando una pipeta serológica de 5 mL, se realizaron dos lavados a la capa celular con solución PBS (0.004% EDTA), inmediatamente se añadió 1 mL de Tripsina-EDTA (0.05%) y se incubaron a 37 °C por 15 min. Se tomó una muestra de 20 µL y se le añadieron 20 µL de azul de tripano al 0.4% (Gibco, Carlsbad, CA, USA); esto para llevar a cabo un recuento celular en cámara de Neubauer para ajustar la concentración celular a 5x10<sup>4</sup> células por reacción con medio Dulbecco's Modified Eagle's (D-MEM) suplementado al 10% de suero fetal bovino. Seguido a esto se sembraron 50 µL de la suspensión celular, se llevó a cabo una incubación a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> hasta obtener confluencia (48 h), posteriormente se aplicaron diferentes concentraciones de propóleo (50 a 0.024 mg/mL) y se incubaron las placas durante 48 horas. Como control negativo se utilizó sólo medio de cultivo D-MEM y como control positivo Triton X-100.<sup>66</sup>

En seguida se descartó el medio y se aplicó un lavado a la capa celular con solución PBS (0.004% EDTA) y se agregó 50 µL de medio de cultivo D-MEM. A cada pocillo se le añadió 20 µL de MTT (5 mg/mL) y luego los cultivos se incubaron por 4 horas. Transcurrido ese tiempo, el medio fue aspirado. Se agregaron 200 µL de DMSO para disolver los cristales de formazan formados; la placa se dejó en agitación 15 min a 120 rpm para asegurar una disolución completa. Finalmente, la lectura de la placa se realizó a 570 nm en un lector Smart Spectrophotometer plus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Se calculó el porcentaje de células viables en cada pozo en relación con las células de control (medio de cultivo) establecidas al 100%. Las respuestas de citotoxicidad se clasificaron como severas (30%), moderadas (30-60%), leves (60-90%) o no citotóxicas (>90%).<sup>65</sup>

***Criterios de decisión:*** Luego de evaluar la citotoxicidad, se decidió realizar el fraccionamiento y evaluación antimicrobiana de aquellos residuos que presentaron una viabilidad superior al 90% sobre la línea celular HGF-1 - ATCC CRL-2014.

### **Concentración Mínima Inhibitoria**

El método empleado fue el de microdilución en caldo usando placas de microtitulación de 96 pozos donde se colocó 140 µL de TSB a los pozos del 2B al 11B, luego se colocó 140 µL de propóleo en el pozo 2B, luego con una micropipeta se tomó 140 µL del pozo 2B y se colocó en el pozo 3B respectivamente, luego se homogenizó y se repitió la misma metodología hasta llegar al pozo 11B para finalmente descartar 140 µL. Posteriormente se agregó 20 µL del cultivo a los pozos 2B al 11B de la bacteria en estudio calibrada a la escala de McFarlan de 0.5. Luego se llevó a incubar a 37°C por 48 horas en condiciones de anaerobiosis usando sobres generadores de anaerobiosis (Oxoid). Se empleó como control positivo la clorhexidina a 0.12% y como control negativo la solución diluida de DMSO con agua Milli-Q (1:1). Todo el procedimiento fue repetido 4 veces para cada uno de los propóleos que presentaron el mayor halo de inhibición.<sup>63</sup>

La lectura de la concentración mínima inhibitoria de los propóleos se determinó de acuerdo con la concentración del pozo donde no se observó desarrollo (turbidez). Para verificar la viabilidad bacteriana se sembró 5 µL de cada pozo en TSA (*S. gordonii*) y TSA suplementada con sangre de carnero, hemina (5 mg/L) y menadiona (1 mg/L) para *F. nucleatum*, considerando la concentración mínima bactericida aquella donde no hubo crecimiento de colonias.<sup>63</sup>

**Criterios de decisión:** Luego de determinar la concentración mínima inhibitoria de aquellas fracciones con halo de inhibición sobre ambas cepas estudiadas, se decidió continuar con la evaluación sobre el biofilm considerando aquellas concentraciones con efecto antibacteriano y no tóxicas sobre la línea celular HGF-1 - ATCC CRL-2014.

### **Formación de biofilm de dos especies**

Para formar el biofilm se usó bacterias orales *S. gordonii* ATCC® 51656™ (colonizador primario) y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ (colonizador secundario) sobre láminas porta objetos Nunc Lab-Tek Chamber Slide™ system.<sup>67-69</sup>

Se inoculó cada cepa a partir de una colonia en 15 mL de TSB y se incubó a 37°C en anaerobiosis hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento de *S. gordonii* por el periodo de 4 h y 30 min y *F. nucleatum* por 8 h a con densidad óptica de 550 nm, 0.125 con  $150 \times 10^6$  células/mL.<sup>67</sup>

Posteriormente, se prepararon las superficies de las láminas Lab Tek con 30  $\mu$ l de Poly – L- lisyne incubado a temperatura ambiente por 30 min y luego se dejó secar a 37 °C por 24 h en condiciones de esterilidad. Se agregó 300  $\mu$ l de saliva artificial e incubó a 4°C x 16h. Posteriormente se hicieron lavados con 300  $\mu$ l de PBS (1X) 2 veces. Se agregó 280  $\mu$ l de BHI + sacarosa 2.5%. Y finalmente, se inoculó 10  $\mu$ l de *S. gordonii* + 10  $\mu$ l de *F. nucleatum* y luego se incubó cada lamina por 24 h a 37°C en condiciones de anaerobiosis.<sup>67</sup>

### **Análisis de biofilm por PCR**

El análisis del biofilm por PCR, se realizó en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para comprobar la presencia de ambas especies, se extrajo ADN de los biofilms cultivados a las 48 y 120 horas. Para realizar la extracción se agregó 75 $\mu$ L de SDS al 10%, luego se agregó 20 $\mu$ L de proteinasa K (20mg/mL), se mezcló mediante vortex y dejó incubar por 3 horas a 65°C. Se mezcló mediante vortex cada media hora, observando que la muestra se encuentre completamente homogénea. Luego se añadió 100  $\mu$ L de NaCl 5M, luego se agregó 100  $\mu$ l CTAB/NaCl (previamente calentado a 65°C), Se mezcló mediante vortex suavemente e incubó durante 10 minutos a 65°C. Se adicionó 750  $\mu$ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló mediante vortex y centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga (Eppendorf). Se añadió 750  $\mu$ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló mediante vortex y centrifugó a 10000 rpm por 5

minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Luego se añadió 1mL de etanol absoluto frío y se colocó a -70 °C por 20 minutos.<sup>67</sup>

Se centrifugó a 10000 rpm por 8 minutos. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1mL de etanol al 70% previamente enfriado y se centrifugó a 10000 rpm por 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento (pellet) colocando el tubo boca abajo con la tapa abierta sobre un papel toalla. Se dejó eluir el ADN en 30-50 µl de Tris – EDTA (buffer de elución).<sup>67</sup>

Para realizar la verificación de la integridad de los ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer Tris-acetate-EDTA (TAE 1X). Se conectó los electrodos y realizó la corrida electroforética a 80V durante 40 – 50 minutos, finalmente se sumergió el gel en una bandeja conteniendo agua destilada y 20 µL de bromuro de etidio por unos 15 minutos, luego se sumergió en una bandeja conteniendo agua destilada y finalmente se colocó en el transluminador de UV para visualizar las bandas y determinar el peso molecular por comparación de los patrones.<sup>67</sup>

Se cuantificó la concentración del ADN en Nanodrop (Thermo Scientific), y empleando Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific).

Para la cuantificación absoluta por PCR en tiempo real, se utilizó 100 ng/µL para todas las muestras con la finalidad de determinar la proporción de células de ambas especies.

La identificación de *S. gordonii*<sup>69,70</sup> y *F. nucleatum*<sup>68,71</sup> fue realizada empleando los primers específicos:

srtA F 5' TATTATGGTGCTGGTACGATGAAAGAGACTC 3' y

srtA R 5' TATAGATTTTCATACCAGCCTTAGCACGATC 3', y

radD F 5' GGATTTATCTTTGCTAATTGGGGAAATTATAG 3' y

radD R 5' ACTATTCCATATTCTCCATAATATTTCCCATTAGA 3',

respectivamente, y se cuantificó el número de células de cada especie presentes en el biofilm, en base a una curva estándar.

### **Evaluación del efecto de los propóleos sobre el biofilm**

Para realizar la evaluación del efecto de los propóleos sobre el biofilm se inoculó 10 µL de *S. gordonii* + 10 µL de *F. nucleatum* y luego se incubó cada lámina por 24 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis. Se empleó la fracción de propóleo con mayor efecto antibacteriano y menor toxicidad frente a células constitutivas.

La primera dosis del extracto del propóleo fue administrado pasadas las 24 horas de su conformación donde se procedió a retirar cuidadosamente el sobrenadante de cada pozo. Luego se hicieron lavados sin ejercer mucha fuerza con 300 µL de PBS (1X) 2 veces. Se administró 300 µL de propóleo e incubó por 1 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se retiró e hicieron lavados a la superficie de cada pozo con 300 µL de PBS (1X) 2 veces.

Luego se agregó 300 µL de medio de cultivo estéril BHI + SAC. 2.5% y se incubó a 37 °C x 24horas en condiciones de anaerobiosis.<sup>67</sup>

Se conformaron los siguientes grupos:

- Grupo 1 (Sg + Fn): Se administró 300  $\mu$ L de propóleo en cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 2 días (48 horas) y 4 días (120 horas).
- Grupo 2 (control negativo): Se administró 300  $\mu$ L DMSO + agua Milli lq (1:1) en la superficie de cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 2 días (48 horas) y 4 días (120 horas).
- Grupo 3 (control positivo): Se administró 300  $\mu$ L de Clorhexidina al 0.12% en la superficie de cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 2 días (48 horas) y 4 días (120 horas). Se realizó 3 repeticiones de cada grupo.

La exposición final de la lámina se produjo cuando los biofilms alcanzaron las 120 horas de maduración donde se realizó el procedimiento de fijación y tinción de Nunc Lab-Tek Chamber Slide™ system con los fluorocromos para la microscopia confocal.

### **Fijación y tinción de láminas**

Para la fijación y tinción, estas fueron retiradas de la jarra de anaerobiosis y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante de cada pozo mediante lavados con 300  $\mu$ L de PBS-1X, pH 7.0 (el PBS 1X estuvo a temperatura ambiente), Cada lavado fue realizado 3 veces durante 10 segundos, con ayuda de una pipeta Pasteur (con la finalidad de retirar el medio de cultivo remanente y bacterias no adheridas). Luego se desmontó la cámara extraíble de la superficie de la lámina Lab Tek, y se colocó

de forma horizontal para fijar a cada superficie de cada pozo con 30 ul de paraformaldehído al 4% (PFA 4%, a temperatura ambiente) sobre toda la superficie del biofilm, se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Luego se realizaron tres lavados suaves con PBS 1X. y se tiñó 5 uL del kit L13152 LIVE/DEAD® BacLight Bacterial en un ratio de concentración de fluorocromos 1:1 sobre la superficie del biofilm. Este kit está conformado por el fluorocromo SYTO 9 que penetra en todas las bacterias presentes en una muestra, tanto en membranas celulares intactas como dañadas y el Ioduro de Propidio que penetra únicamente en bacterias con membranas dañadas, causando una reducción de la fluorescencia del SYTO 9 cuando los dos fluorocromos están presentes en la misma célula. Luego se tiño con 5 uL de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) y la solución de montaje (Vectashield Hardset Antifade Mounting Media with DAPI, Vector Laboratories, H-1500), este último paso con la finalidad de diferenciar los ácidos nucleicos (DNA) en las bacterias y conservar las muestras.<sup>67</sup>

Para el transporte de las láminas hasta el lugar donde se realizó las lecturas, se colocó sobre la lámina teñida un cubreobjetos que fue fijado en los bodes con barniz sellador. Luego se ubicó cada lámina dentro de una caja porta laminas con una base de papel toalla húmedo con PBS-1X, pH 7.0 con el objetivo de mantenerlas hidratadas y protegerlas de la luz.

### **Medición del espesor de los biofilms**

La evaluación del espesor del biofilm se realizó en el Microscope Core, Neuroscience Department, School of Medicine. University of California San Diego - USA mediante el Microscopio confocal LSM880 (Zeiss), con la colaboración del Dr. Jaeson Calla Choque, quien realizó las lecturas y medición del espesor de los biofilms (crecimiento vertical) a través del microscopio confocal LSM880 (Zeiss) mediante la opción Z-Stacks (imágenes en 3D), donde el número de cortes dependió de la altura del biofilm, cada corte debe sobrelapar el 10% del siguiente corte, y el intervalo fue de 0.18  $\mu\text{m}$  (para poder realizar una cobertura y reconstrucción del 100%).

Las imágenes fueron capturadas con el objetivo Zeiss Plan-Apochromat de 63x/1.4 oil objective, con dos diferentes zooms (1 y 4), para ello las imágenes fueron procesadas mediante el software Zen Black (Zeiss) y la lectura de resultados se realizó en micrómetros ( $\mu\text{m}$ ). Finalmente, la reconstrucción de las imágenes fue exportada en formato TIF. (Imagen 1-5)

### **Consideraciones éticas**

La presente investigación fue un estudio in vitro realizado en cepas patrón ATCC. Se encuentra registrado con Código SIDISI N° 66846 y contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (Anexos 1 y 2)

### **Plan de análisis**

Los datos de la serie de experimentos realizados en secuencia fueron organizados en una base de datos elaborada en EXCEL, para ser presentados en tablas con

medias y desviaciones estándar. Inicialmente, se empleó IBM SPSS STATISTICS, versión 26, para probar el efecto de los tratamientos mediante técnicas paramétricas (ANOVA, comparaciones múltiples, evaluación de supuestos de homogeneidad de varianzas y normalidad). Los resultados de las pruebas no se reportan debido a la evasión de alguno de los supuestos, lo que determinó que se recurriera a la aplicación de métodos no paramétricos, complementando el análisis con el programa MINITAB, versión 19.

Las pruebas estadísticas realizadas fueron las siguientes:

La prueba de Kruskal-Wallis, compara los rangos promedios de cada tratamiento con el rango promedio de todos ellos, y prueba la hipótesis de que la distribución del halo de inhibición de la bacteria es la misma para cada tipo de propóleo. SPSS, considera los ajustes por empates, y Minitab proporciona ambos resultados, con y sin empates.

Prueba de Z, compara individualmente el rango promedio de cada tipo de propóleo respecto el rango promedio de todos ellos.

Los valores Z se interpretan como sigue:

Mientras mayor sea el valor absoluto, más lejos estará el rango promedio de un grupo del rango promedio general

Un valor de Z negativo indica que el rango promedio de un grupo es menor que el rango promedio general.

Un valor  $Z$  positivo indica que el rango promedio de un grupo es mayor que el rango promedio general.

Prueba de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis, pruebas post hoc. Se han extraído sólo los propósitos más importantes para los procesos de decisión en los experimentos secuenciales.

### III. RESULTADOS

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto antibacteriano del extracto bruto orgánico (EBO) de 13 propóleos del ande peruano (Tabla 2). La prueba H de Kruskal-Wallis indica diferencia entre algunos de los propóleos en experimentación y/o controles en la inhibición del crecimiento tanto de *S. gordinii* ( $p < 0.001$ ) como de *F. nucleatum* ( $p < 0.001$ ). Asimismo, la prueba Z revela que, junto con la clorhexidina ( $14.45 \pm 0.30$  y  $14.40 \pm 0.18$  mm), los propóleos que superan a la inhibición promedio en ambos tipos de bacterias son los procedentes de Oxapampa ( $10.88 \pm 0.10$  y  $10.88 \pm 0.10$  mm), Chontabamba ( $10.0 \pm 0.16$  y  $10.05 \pm 0.19$  mm), Saylla ( $10.00 \pm 0.18$  y  $10.00 \pm 0.14$  mm) y Yura ( $9.98 \pm 0.17$  y  $10.00 \pm 0.16$  mm). Al realizar las comparaciones post hoc de los mejores propóleos con la clorhexidina, se evidenció que la diferencia de sus rangos promedios no es estadísticamente significativa, por lo que en la tabla 2 se muestra con una misma letra.

Al evaluar las particiones de los EBOs con mayor efecto antibacteriano (Tabla 3), la prueba H de Kruskal-Wallis indica diferencia entre algunos de las particiones de propóleo en experimentación y/o controles en la inhibición del crecimiento tanto de *S. gordinii* ( $p < 0.001$ ) como de *F. nucleatum* ( $p < 0.001$ ). Asimismo, la prueba Z revela que, junto con la clorhexidina ( $14.45 \pm 0.30$  y  $14.40 \pm 0.18$  mm), la partición que supera a la inhibición promedio en ambos tipos de bacterias es el residuo clorofórmico de Oxapampa ( $9.40 \pm 0.28$  y  $9.95 \pm 0.19$  mm). El residuo clorofórmico

de Saylla ( $10.2 \pm 0.14$  mm) y el residuo clorofórmico de Yura ( $9.27 \pm 0.05$  mm) superan al promedio en la inhibición de *S. gordonii*; así como el residuo butanólico de Saylla ( $9.98 \pm 0.21$  mm) y el residuo butanólico de Oxapampa ( $9.45 \pm 0.19$  mm) en la inhibición de *F. nucleatum*. Al realizar las comparaciones post hoc de los mejores propóleos con la clorhexidina, se evidenció que la diferencia de sus rangos promedios no es estadísticamente significativa, por lo que en la tabla 3 se muestra con una misma letra.

Al evaluar la citotoxicidad de las particiones de propóleo sobre la línea celular HFF-1 considerando a Triton X-100 10% (control negativo) y el medio (control positivo) (Tabla 4), se observa por lo general que, al aumentar la dilución, disminuye la viabilidad celular de las particiones de los propóleos evaluados. La partición clorofórmica del propóleo de Oxapampa presenta un porcentaje de viabilidad celular mayor (92.64%) al 0.78 mg/ mL de dilución.

Al evaluar el efecto antibacteriano de las fracciones de la partición clorofórmica del propóleo de Oxapampa (Tabla 5) mediante la prueba H de Kuskall-Wallis, mostró que hay diferencia en la inhibición de *S. gordinii* ( $p < 0.01$ ) y *F. nucleatum* ( $p < 0.01$ ) preparado en las distintas diluciones, siendo la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa ( $12.55 \pm 0.19$  y  $12.15 \pm 0.19$  mm) con mayor poder de inhibición sobre ambas bacterias que conjuntamente con la clorhexidina ( $14.55 \pm 0.19$  y  $14.33 \pm 0.19$  mm) superan al promedio. Y, el análisis post hoc, revela que ambas no se diferencian entre sí, pero tienen mayor poder de inhibición con respecto a ambas bacterias.

La concentración mínima inhibitoria de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa sobre las cepas de cepas de *S. gordonii* ATCC 51656 y *F. nucleatum* ATCC 10953 se encuentra en la concentración de 0.78 mg/mL (Tabla 6).

Al evaluar la citotoxicidad de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa sobre la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014, se encontró que las concentraciones con efecto antibacteriano no tóxicas (> al 90% de viabilidad celular)<sup>67</sup> fueron 0.781 y 1.563 mg/mL. (Tabla 7).

Al evaluar las concentraciones de 0.781 y 1.563 mg/mL. de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa sobre espesor del biofilm mediante microscopia confocal, la prueba H de Kuskall-Wallis, indica que hay diferencia en el espesor del biofilm, tanto a las 48 horas ( $p < 0.01$ ) como a las 120 horas ( $p < 0.001$ ), formados con los distintos tratamientos. El biofilm formado con 0.12% clorhexidina ( $8.100 \pm 1.149$  y  $45.200 \pm 5.718 \mu\text{m}$ ), no es inferior al promedio, como puede observarse en la tabla 8, ni a las 48 horas ni a las 120 horas ( $p > 0.05$ ). Los biofilm con menor grosor que el promedio son los formados con 0.78 mg/ $\mu\text{L}$  propóleo ( $8.026 \pm 1.609$  y  $6.840 \pm 1.675 \mu\text{m}$ ) y 1.56 mg/ $\mu\text{l}$  propóleo ( $7.374 \pm 1.620$  y  $9.248 \pm 0.679 \mu\text{m}$ ). Pero, las pruebas post hoc, indican que éstos no se diferencian con la clorhexidina en el biofilm formado a las 48 horas, pero a las 120 horas si bien no se diferencian entre sí, el propóleo elaborado con una concentración de 0.78 mg/ $\mu\text{L}$  presenta menor grosor que el de la clorhexidina.

Al evaluar el efecto de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo Oxapampa en la cantidad de bacterias mediante la cuantificación del número de copias de los genes *srtA* de *S. gordonii* y *radD* de *F. nucleatum* en el biofilm mediante PCR, la prueba H de Kuskall-Wallis indica que hay diferencia en la cantidad de bacterias de *S. gordonii* ( $p < 0.01$ , en ambos periodos) y de *F. nucleatum* ( $p < 0.05$  en ambos periodos), con los distintos tratamientos. La concentración del propóleo a 1.56 mg/mL disminuyó la cantidad de *S. gordonii* tanto a las 48 ( $6.347 \pm 0.410$ ) como a las 120 horas ( $5.157 \pm 0.202$ ) así mismo disminuyó cantidad de bacterias. de *F. nucleatum* a las 120 horas ( $5.747 \pm 0.618$ ) en comparación con el promedio, junto con la clorhexidina 0.12%). Pero, el análisis de post hoc, indica que esta concentración no muestra diferencia con la clorhexidina, en el control del desarrollo de ambas bacterias en los periodos evaluados.

**Tabla 2. Efecto antibacteriano de extractos brutos orgánicos de 13 propóleos peruanos sobre cepas de *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.**

|                          | Halos de Inhibición (mm)                    |     |   |  |     |   |
|--------------------------|---|-----|---|--|-----|---|
|                          | <i>S. gordonii</i> ATCC. 51656 <sup>1</sup> |     |   | <i>F. nucleatum</i> ATCC. 10953 <sup>1</sup> |     |   |
|                          | Rango <sup>2,3</sup>                        |     |   | Rango <sup>2,3</sup>                         |     |   |
| Yanasara                 | 35.9  | ns  |   | 34.5   | ns  |   |
| Vitor                    | 35.9  | ns  |   | 38.5   | ns  |   |
| Shiymay                  | 11  | ++  |   | 16.5   | +   |   |
| Chontabamba              | 46.8  | *   | a | 47.4   | *   | a |
| San Miguel de Aco        | 11  | ns  |   | 16.5   | ns  |   |
| Saylla                   | 46.6  | *   | a | 46.1   | *   | a |
| Chanchamayo              | 31.8  | ns  |   | 16.5   | +   |   |
| Caraz                    | 11  | ++  |   | 16.5   | +   |   |
| Marcará                  | 20.8  | ns  |   | 16.5   | +   |   |
| La merced                | 25.8  | ns  |   | 16.5   | +   |   |
| Yura                     | 46.1  | *   | a | 46   | *   | a |
| Oxapampa                 | 54.5  | **  | a | 54.5   | **  | a |
| Siguas                   | 11  | ns  |   | 16.5   | +   |   |
| Clorhexidina 0.12%       | 58.5  | *** | a | 58.5   | *** | a |
| DMSO + agua Mili-Q (1:1) | 11  | ++  |   | 16.5   | +   |   |
| General                  | 30.5  |     |   | 30.5   |     |   |

<sup>1</sup> H Kruskal-Wallis, *S. gordonii* ATCC. 51656 (p=0.000<0.001) y *F. nucleatum* ATCC. 10953 (p=0.000<0.001), ajustada por empates

<sup>2</sup> Prueba Z, para valores p (<0.05, <0.01 y <0.001): \*,\*\* o \*\*\* mayor al rango medio y +, ++ o +++ menor al rango medio, y ns: no significativo.

<sup>3</sup> Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, donde la misma letra indica no diferencia entre los tratamientos que superan al promedio

**Tabla 3. Efecto antibacteriano de las particiones de extractos brutos orgánicos de propóleos peruanos que mostraron actividad antibacteriana sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.**

| Propóleo                 | Partición            | Halos de Inhibición (mm)                    |     |   |  |       |
|--------------------------|----------------------|---|-----|---|--|-------|
|                          |                      | <i>S. gordonii</i> ATCC. 51656 <sup>1</sup> |     |   | <i>F. nucleatum</i> ATCC. 10953 <sup>1</sup> |       |
|                          |                      | Rango <sup>2,3</sup>                        |     |   | Rango <sup>2,3</sup>                         |       |
| Chontabamba              | Residuo acuoso       | 12.5  | +   |   | 10.5   | ++    |
|                          | Residuo clorofórmico | 45.1  | **  | a | 37.9   | ns    |
|                          | Residuo butanólico   | 12.5  | +   |   | 30   | ns    |
| Saylla                   | Residuo acuoso       | 12.5  | +   |   | 10.5   | ++    |
|                          | Residuo clorofórmico | 49.5  | **  | a | 27   | ns    |
|                          | Residuo butanólico   | 27  | ns  |   | 48.6   | ** a  |
| Yura                     | Residuo acuoso       | 12.5  | +   |   | 10.5   | ++    |
|                          | Residuo clorofórmico | 39.9  | *   | a | 22.5   | ns    |
|                          | Residuo butanólico   | 35.6  | ns  |   | 36   | ns    |
| Oxapampa                 | Residuo acuoso       | 12.5  | +   |   | 10.5   | ++    |
|                          | Residuo clorofórmico | 40  | *   | a | 48.4   | ** a  |
|                          | Residuo butanólico   | 32.4  | ns  |   | 41.6   | * a   |
| Clorhexidina 0.12%       |                      | 54.5  | *** | a | 54.5   | *** a |
| DMSO + agua Mili-Q (1:1) |                      | 12.5  | +   |   | 10.5   | ++    |
| General                  |                      | 28.5  |     |   | 28.5   |       |

<sup>1</sup> H Kruskal-Wallis, *S. gordonii* ATCC. 51656 (p=0.000<0.001) y *F. nucleatum* ATCC. 10953 (p=0.000<0.001), ajustada por empates

<sup>2</sup> Prueba Z, para valores p (<0.05, <0.01 y <0.001): \*,\*\* o \*\*\* mayor al rango medio y +, ++ o +++ menor al rango medio, y ns: no significativo.

<sup>3</sup> Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, donde la misma letra indica no diferencia entre los tratamientos que superan al promedio

**Tabla 4. Citotoxicidad de las particiones de propóleo con mayor efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014.**

| Diluciones<br>mg/mL | Medio | Viabilidad Celular (%) |                             |                           |                        |                      |                      |                    |                          |                        |
|---------------------|-------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
|                     |       | Triton X-<br>100 10%   | Chontabamba<br>clorofórmica | Chontabamba<br>butanólica | Saylla<br>clorofórmica | Saylla<br>butanólica | Yura<br>clorofórmica | Yura<br>butanólica | Oxapampa<br>clorofórmica | Oxapampa<br>butanólica |
| <b>50</b>           | 100   | 0.815                  | 41.351                      | 14.799                    | 12.279                 | 1.913                | 2.019                | 2.3                | 52.657                   | 2.386                  |
| <b>25</b>           | 100   | 0.815                  | 45.402                      | 17.665                    | 13.275                 | 2.945                | 3.432                | 3.565              | 64.892                   | 3.516                  |
| <b>12.5</b>         | 100   | 0.815                  | 51.871                      | 22.049                    | 14.685                 | 4.374                | 4.639                | 4.9                | 76.912                   | 4.701                  |
| <b>6.25</b>         | 100   | 0.815                  | 64.586                      | 27.1                      | 16.759                 | 7.178                | 7.12                 | 6.969              | 78.735                   | 6.981                  |
| <b>3.125</b>        | 100   | 0.815                  | 71.462                      | 31.962                    | 19.266                 | 9.018                | 9.153                | 9.372              | 85.41                    | 9.154                  |
| <b>1.563</b>        | 100   | 0.815                  | 80.581                      | 37.652                    | 21.285                 | 11.065               | 11.289               | 11.727             | 90.931                   | 11.288                 |
| <b>0.781</b>        | 100   | 0.815                  | 84.327                      | 46.334                    | 23.325                 | 13.223               | 13.42                | 14.601             | 92.641                   | 14.478                 |
| <b>0.39</b>         | 100   | 0.815                  | 85.852                      | 55.664                    | 24.71                  | 14.52                | 12.045               | 15.101             | 93.905                   | 21.212                 |
| <b>0.195</b>        | 100   | 0.815                  | 88.557                      | 71.185                    | 36.872                 | 19.992               | 16.333               | 23.165             | 94.956                   | 23.939                 |
| <b>0.098</b>        | 100   | 0.815                  | 91.667                      | 78.38                     | 58.387                 | 29.697               | 24.874               | 35.356             | 96.52                    | 36.05                  |
| <b>0.049</b>        | 100   | 0.815                  | 95.817                      | 83.439                    | 83.297                 | 42.095               | 35.41                | 46.607             | 96.973                   | 53.907                 |
| <b>0.024</b>        | 100   | 0.815                  | 98.845                      | 89.856                    | 98.856                 | 80.69                | 55.147               | 59.85              | 97.323                   | 88.647                 |

**Tabla 5. Efecto antibacteriano de las fracciones seleccionadas de propóleos sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.**

| Propóleo                 | Fracción                 | Halos de Inhibición (mm)                    |     |   |  |     |   |
|--------------------------|--------------------------|---|-----|---|--|-----|---|
|                          |                          | <i>S. gordonii</i> ATCC. 51656 <sup>1</sup> |     |   | <i>F. nucleatum</i> ATCC. 10953 <sup>1</sup> |     |   |
|                          |                          | Rango <sup>2,3</sup>                        |     |   | Rango <sup>2,3</sup>                         |     |   |
|                          | F. del éter del petróleo | 6.5   | +   | b | 6.5  | +   | b |
| Oxapampa                 | F. del diclorometano     | 6.5   | +   | b | 6.5  | +   | b |
|                          | F. metanólica            | 14.5  | *   | a | 14.5   | *   | a |
| Clorhexidina 0.12%       |                          | 18.5  | *** | a | 18.5   | *** | a |
| DMSO + agua Mili-Q (1:1) |                          | 6.5   | +   | b | 6.5  | +   | b |
| General                  |                          | 10.5  |     |   | 10.5   |     |   |

<sup>1</sup> H Kruskal-Wallis, *S. gordonii* ATCC. 51656 (p=0.001<0.01) y *F. nucleatum* ATCC. 10953 (p=0.001<0.01), ajustada por empates

<sup>2</sup> Prueba Z, para valores p (<0.05, <0.01 y <0.001): \*,\*\* o \*\*\* mayor al rango medio y +, ++ o +++ menor al rango medio, y ns: no significativo.

<sup>3</sup> Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, donde la misma letra indica no diferencia entre los tratamientos que superan al promedio

**Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™.**

| Concentración (mg/mL)    | Crecimiento bacteriano            |                                    |
|--------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
|                          | <i>S. gordonii</i> ATCC.<br>51656 | <i>F. nucleatum</i> ATCC.<br>10953 |
| 25                       | negativo                          | negativo                           |
| 12.5                     | negativo                          | negativo                           |
| 6.25                     | negativo                          | negativo                           |
| 3.12                     | negativo                          | negativo                           |
| 1.56                     | negativo                          | negativo                           |
| 0.78                     | negativo                          | negativo                           |
| 0.39                     | positivo                          | positivo                           |
| 0.19                     | positivo                          | positivo                           |
| 0.09                     | positivo                          | positivo                           |
| 0.04                     | positivo                          | positivo                           |
| 0.02                     | positivo                          | positivo                           |
| 0.01                     | positivo                          | positivo                           |
| Clorhexidina 0.12%       | negativo                          | negativo                           |
| DMSO + agua Mili-Q (1:1) | positivo                          | positivo                           |

**Tabla 7. Citotoxicidad de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014.**

| <b>Diluciones mg/mL</b> | <b>Medio</b> | <b>Triton X-100 10%</b> | <b>viabilidad celular (%)</b> |
|-------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------------|
| <b>50</b>               | 100          | 0.55789474              | 43.474                        |
| <b>25</b>               | 100          | 0.55789474              | 49.158                        |
| <b>12.5</b>             | 100          | 0.55789474              | 61.158                        |
| <b>6.25</b>             | 100          | 0.55789474              | 63.158                        |
| <b>3.125</b>            | 100          | 0.55789474              | 68.421                        |
| <b>1.563</b>            | 100          | 0.55789474              | 93.411                        |
| <b>0.781</b>            | 100          | 0.55789474              | 94.000                        |
| <b>0.39</b>             | 100          | 0.55789474              | 95.158                        |
| <b>0.195</b>            | 100          | 0.55789474              | 96.211                        |
| <b>0.098</b>            | 100          | 0.55789474              | 97.263                        |
| <b>0.049</b>            | 100          | 0.55789474              | 98.000                        |
| <b>0.024</b>            | 100          | 0.55789474              | 99.158                        |

**Tabla 8. Efecto sobre el espesor del biofilm mediante microscopia confocal de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ y no toxica en la línea celular HGF-1-ATCC CRL-2014**

| Concentración       | Espesor biofilm (µm) a 48 horas |     |   | Espesor biofilm (µm) a 120 horas |     |    |
|---------------------|---------------------------------|-----|---|----------------------------------|-----|----|
|                     | Rango <sup>2,3</sup>            |     |   | Rango <sup>2,3</sup>             |     |    |
| 0.78 mg/uL propóleo | 9.1                             | +   | A | 3.3                              | +++ | A  |
| 1.56 mg/uL propóleo | 5.6                             | ++  | A | 7.7                              | +   | AB |
| Clorhexidina 0.12%  | 9.3                             | ns  | A | 13.2                             | ns  | BC |
| DMSO +agua (1:1)    | 21.6                            | *** | B | 20.7                             | **  | C  |
| Sin tratamiento     | 19.4                            | **  | B | 20.1                             | **  | C  |
| General             | 13                              |     |   | 13                               |     |    |

<sup>1</sup> H Kruskal-Wallis, *S. gordonii* ATCC. 51656 (p=0.001<0.01) y *F. nucleatum* ATCC. 10953 (p=0.000<0.001), ajustada por empates

<sup>2</sup> Prueba Z, para valores p (<0.05, <0.01 y <0.001): \*,\*\* o \*\*\* mayor al rango medio y +, ++ o +++ menor al rango medio, y ns: no significativo.

<sup>3</sup> Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, donde la misma letra indica no diferencia entre los tratamientos que están por debajo del promedio

**Tabla 9. Evaluación de la fracción de propóleo con efecto antibacteriano sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ en la cantidad de bacterias mediante la cuantificación del número de copias de los genes *srtA* de *S. gordonii* y *radD* de *F. nucleatum* en el biofilm a través de PCR**

| Tiempo    | Concentración       | <i>S. gordonii</i> ATCC. 51656 <sup>1</sup> |    |     | <i>F. nucleatum</i> ATCC. 10953 <sup>1</sup> |    |     |
|-----------|---------------------|---|----|-----|--|----|-----|
|           |                     | (Log <sub>10</sub> células)                 |    |     | (Log <sub>10</sub> células)                  |    |     |
|           |                     | Rango <sup>2,3</sup>                        |    |     | Rango <sup>2,3</sup>                         |    |     |
| 48 horas  | 0.78 mg/mL propóleo | 8   | ns | ABC | 9.2  | ns | B   |
|           | 1.56 mg/mL propóleo | 4.7   | +  | AB  | 6.8  | ns | AB  |
|           | Clorhexidina 0.12%  | 2.3   | ++ | A   | 2  | ++ | A   |
|           | DMSO +agua (1:1)    | 11  | ns | BC  | 11   | ns | BC  |
|           | Sin tratamiento     | 14  | ns | C   | 11   | ns | BC  |
| 120 horas | 0.78 mg/mL propóleo | 8   | ns | ABC | 6.8  | ns | ABC |
|           | 1.56 mg/mL propóleo | 2.2   | ++ | A   | 3.5  | ++ | A   |
|           | Clorhexidina 0.12%  | 4.8   | +  | AB  | 4.7  | +  | AB  |
|           | DMSO +agua (1:1)    | 11  | ns | BC  | 11   | ns | BC  |
|           | Sin tratamiento     | 14  | ns | C   | 14   | ns | C   |
| General   |                     | 8   |    |     | 8  |    |     |

<sup>1</sup> H Kruskal-Wallis, *S. gordonii* ATCC. 51656 (p=0.009<0.01 y p=0.009<0.01) y *F. nucleatum* ATCC. 10953 (p=0.027<0.05 y p=0.019<0.05), a las 48 y 120 horas, ajustada por empates

<sup>2</sup> Prueba Z, para valores p (<0.05, <0.01 y <0.001): \*,\*\* o \*\*\* mayor al rango medio y +, ++ o +++ menor al rango medio, y ns: no significativo.

<sup>3</sup> Prueba de Dunn para comparaciones múltiples, donde la misma letra indica no diferencia entre los tratamientos que están por debajo del promedio

## IV. DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano de los extractos brutos, particiones y fracciones de propóleos peruanos y el efecto de una fracción sobre el espesor de un biofilm in vitro de *S. gordonii* y *F. nucleatum*. Se demostró que de los 13 extractos brutos de propóleos evaluados, solo 4 de ellos presentaron efecto antibacteriano sobre ambas cepas. Así mismo, la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa presentó efecto sobre el espesor del biofilm creado in vitro. Por otro lado, al lograr estandarizar la creación in vitro de biofilm oral de varias especies, se recomienda continuar realizando estudios que incluyan nuevas especies, obteniendo no solo biofilm periodontales, sino también cariogénicos, endodónticos, entre otros.

Por otro lado, tradicionalmente cuando se han evaluado los efectos antimicrobianos de cualquier producto natural se opta por la elaboración de extractos con diversos tipos de solventes como etanol, metanol, agua o sus combinaciones;<sup>16,25,30,41,84-88</sup> sin embargo, al evaluar solamente el extracto bruto no se llega a conocer si el efecto biológico deseado se debe a todos o solo algunos de los compuestos.

Los resultados de la presente investigación mostraron que, de los trece propóleos peruanos evaluados, cuatro de ellos presentaron efecto antibacteriano sobre ambas cepas evaluadas, Estos resultados difieren de otras investigaciones que evidencian el gran poder antibacteriano de los propóleos frente a todos los microorganismos

evaluados.<sup>14,-16,19,23</sup> Aunque existen diversos estudios de propóleos peruanos que han mostrado efectos sobre bacteria orales, todos ellos han estado enfocados a otros tipos de bacterias orales; así tenemos propóleos de la Libertad sobre *Streptococcus mutans*,<sup>23,82</sup> propóleos de Huacho, Cajabamba sobre *Streptococcus mutans*.<sup>83,84</sup> propóleos de Arequipa, Huánuco y Huaraz sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus oralis*.<sup>85,86</sup> La presente investigación es el primer estudio que ha evaluado propóleos peruanos sobre bacterias vinculadas al crecimiento de biofilms subgingivales.

Los extractos brutos orgánicos de propóleos con los mayores halos de inhibición fueron los procedentes de apiarios de Chontabamba, Saylla, Yura y Oxapampa, siendo este último muy estudiado y con efectos similares en estudios previos.<sup>87-89</sup> La gran vegetación del valle de Oxapampa donde se encuentra en abundancia especies como: *Dictyocaryum lamarckianum* (palmera), *Juglans neotropica* (cedro) *Cyrtocymura scorpioides* (Hierva de San Simón) *Vernonanthur, patens* (Kunth) y *Baccharis latifolia* (Chilca), *Cecropia spp*, *Inga spp* y *Pinus tecunumanii* (Pino rojo), sumado al clima tropical de esta zona (ceja de selva),<sup>90</sup> ofrecen una variedad de componentes activos que son transportados por las abejas a sus colmenas en forma de propóleos,<sup>91-93</sup> potenciando sus propiedades biológicas.

En el presente estudio, luego de identificar a los extractos brutos orgánicos de los cuatro propóleos con mayor halo de inhibición sobre cada bacteria evaluada, se realizó las particiones, encontrando que los mayores efectos antibacterianos se presentaron en los residuos, butanólicos y clorofórmicos de todos los propóleos

estudiados. Aunque no existen estudios con particiones de propóleos peruanos, los pocos realizados con propóleos de otras procedencias indican que algunos solventes podrían tener mayor afinidad por ciertos componentes con efecto biológico,<sup>95</sup> así se encontró que las cantidades de flavonoides y terpenos disminuían en el siguiente orden: extracto clorofórmico > extracto etanólico > extracto butanólico.<sup>96,97</sup>

En Perú, al igual que en muchos países, los apicultores preparan de manera artesanal los productos derivados de la colmena. El propóleo, una sustancia a la que le atribuyen una gran cantidad de efectos terapéuticos,<sup>98</sup>. Sin embargo, muchos de estos productos podrían estar siendo usados sin ningún control, siendo en varios casos, tóxicos para el consumo humano, por tanto, la toxicidad debe reconocerse correctamente y utilizarse de manera razonable.<sup>99</sup> En el presente estudio, se evaluó la toxicidad sobre fibroblastos gingivales a través del porcentaje de viabilidad celular.<sup>65</sup> Se encontró que solo el residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa resultó ser no tóxico, los resultados del ensayo MTT con más de 92% de viabilidad celular, sugieren una buena biocompatibilidad. Aunque existen pocos estudios que han evaluado la citotoxicidad de los propóleos sobre esta línea celular, ellos evidencian que estos son poco tóxicos.<sup>100,101</sup>

Al realizar la evaluación de las fracciones de la partición clorofórmica, se encontró que sólo la fracción metanólica tuvo efecto inhibitorio, siendo su concentración mínima inhibitoria de 0.78 mg/mL sobre ambas cepas evaluadas. Aunque no se han reportado estudios de propóleos peruanos, otras investigaciones de propóleos extranjeros han encontrado resultados similares.<sup>102-105</sup> demostrando que la

extracción metanólica puede producir una mayor concentración de compuestos con actividad biológica.<sup>113</sup>

La mayoría de las bacterias residen de forma natural en acumulaciones llamadas biofilms, que exhiben una tolerancia sustancialmente mayor a los antimicrobianos en comparación con las células flotantes libres.<sup>106</sup> Un biofilm es una comunidad de bacterias que se han adherido a una superficie. Una vez adheridas, las células comienzan a secretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuestas de ADN extracelular, polisacáridos y proteínas. Las EPS atrapan los nutrientes y el agua dentro de la biopelícula, permitiendo que las células maduren en condiciones de riqueza en nutrientes, al tiempo que se protegen de la desecación, las defensas inmunológicas del huésped y los agentes antimicrobianos.<sup>107</sup> En el presente estudio al evaluar el efecto de la fracción metanólica del propóleo sobre el espesor del biofilm, se encontró que ambas concentraciones tuvieron un efecto mayor que la clorhexidina a las 120 horas. Este último resultado podría explicarse porque uno de los factores que contribuyen a la resistencia de las infecciones mediadas por biofilm puede ser el retraso en la penetración de agentes antimicrobianos cargados debido a la unión de la robusta matriz de EPS, lo que impide el acceso completo a toda la biopelícula.<sup>108,109</sup> Sin embargo, la fracción de propóleo a diferencia de la clorhexidina está compuesta por más de un componente activo, incluyendo flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, ácidos aromáticos y otros.<sup>110</sup> Siendo difícil identificar las sustancias químicas exactas que subyacen a un determinado efecto así como; los mecanismos bioquímicos definidos.<sup>111,112</sup>

Por su parte, los resultados mediante PCR mostraron que la concentración de 1.563 mg/mL de la fracción metanólica de propóleo disminuyó la cuantificación del número de copias de los genes *srtA* de *S. gordonii* y *radD* de *F. nucleatum* a las 120 horas. Aunque no existen trabajos previos que evalúen el efecto de propóleos sobre biofilms de estas especies, se han desarrollado investigaciones que sugieren que el propóleo tiene un efecto dosis-dependiente en la inhibición de los genes implicados la adherencia, mostrando un potencial más allá de la inhibición del crecimiento bacteriano.<sup>34,36</sup>

Los productos naturales representan potenciales agentes de control para ser utilizados en tratamientos dentales terapéuticos.<sup>110,111</sup> En el presente estudio destacó el efecto antibacteriano y antibiofilm in vitro de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa. A pesar de los resultados prometedores, se debe enfatizar que este ensayo experimental no refleja las complejas interacciones polimicrobianas y ambientales presentes en la cavidad bucal. Por otro lado, complementar los resultados de este estudio con la separación y la identificación de los componentes, comprender las dianas terapéuticas, así como, los mecanismos de acción de estos propóleos ayudarían a evaluar nuevas moléculas para la formulación de nuevos suministros farmacológicos que podrían ser valiosos en el campo de la odontología.

## V. CONCLUSIONES

Los extractos brutos orgánicos de los propóleos de Chontabamba, Saylla, Yura y Oxapampa presentaron efecto antibacteriano sobre cepas de *S. gordonii* ATCC® 51656<sup>TM</sup> y *F. nucleatum* ATCC® 10953<sup>TM</sup>.

Los residuos clorofórmicos de los propóleos de Chontabamba, Saylla, Yura y Oxapampa presentaron efecto antibacteriano sobre cepas de *S. gordonii* ATCC® 51656<sup>TM</sup> y los residuos butanólicos de los propóleos de Saylla y Oxapampa presentaron efecto antibacteriano sobre cepas *F. nucleatum* ATCC® 10953<sup>TM</sup>. Solo el residuo clorofórmico de los propóleos de Oxapampa tuvo efecto sobre ambas cepas.

El residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa fue el único residuo que no presentó toxicidad sobre la línea celular HGF-1 - ATCC CRL-2014.

La fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa presentó efecto antibacteriano sobre cepas de *S. gordonii* ATCC® 51656<sup>TM</sup> y *F. nucleatum* ATCC® 10953<sup>TM</sup>.

La concentración mínima inhibitoria de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleos de Oxapampa sobre cepas *S. gordonii* ATCC® 51656<sup>TM</sup> y *F. nucleatum* ATCC® 10953<sup>TM</sup> fue de 0.78 mg/mL.

La fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleos de Oxapampa no presentó toxicidad sobre la línea celular HGF-1 - ATCC CRL-2014 en las diluciones de 0.78 mg/mL y 1.563 mg/mL.

Las concentraciones de 0.78 mg/mL y 1.563 mg/mL. de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleos de Oxapampa presentaron efecto sobre el espesor del biofilm a las 48 y 120 horas.

La concentración de 1.563 mg/mL. de la fracción metanólica del residuo clorofórmico del propóleos de Oxapampa presentó efecto sobre el número de copias del gen *srtA* de *S. gordonii* ATCC® 51656™ y gen *radD* de *F. nucleatum* ATCC® 10953™ a las 120 horas, mientras que a las 48 horas solo presentó efecto sobre el número de copias del gen *srtA* de *S. gordonii* ATCC® 51656™.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda continuar con esta línea de investigación realizando un estudio estacional, así como, la identificación y cuantificación de los componentes en el propóleo de Oxapampa.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choi JU, Lee JB, Kim KH, Kim S, Seol YJ, Lee YM, Rhyu IC. Comparison of Periodontopathic Bacterial Profiles of Different Periodontal Disease Severity Using Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Nov 17;10(11):965.
2. Geng H, Yuan Y, Adayi A, Zhang X, Song X, Gong L, et al. Engineered chimeric peptides with antimicrobial and titanium-binding functions to inhibit biofilm formation on Ti implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018;82:141-54
3. Lazar V, Saviuc CM, Chifiriuc MC. Periodontitis and Periodontal Disease - Innovative Strategies for Reversing the Chronic Infectious and Inflammatory Condition by Natural Products. *Curr Pharm Des*. 2016;22(2):230-37.
4. Slobodníková L, Fialová S, Rendeková K, Kováč J, Mučaji P. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules*. 2016;21(12):1717.

5. Arbia L, Chikhi-Chorfi N, Betatache I, Pham-Huy C, Zenia S, Mameri N, Drouiche N, Lounici H. Antimicrobial activity of aqueous extracts from four plants on bacterial isolates from periodontitis patients. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017;24(15):13394-13404.
6. Lee J, Nho YH, Yun SK, Hwang YS. Use of ethanol extracts of *Terminalia chebula* to prevent periodontal disease induced by dental plaque bacteria. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):113.
7. Van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol.* 2005;32(8):893-98.
8. Kouidhi B, Al Qurashi YM, Chaieb K. Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microb Pathog.* 2015;80:39-49.
9. Rams TE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol.* 2014;85(1):160-69.

10. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiol Immunol.* 1988;3(1):1.
11. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR, Deegan KR, Araújo RP, Umsza-Guez MA, et al. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J Sci Food Agric.* 2020;100(4):1369.
12. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Casarin RCV, Alencar SM, Rosalen PL, Mayer MPA. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. *J Ethnopharmacol.* 2017;207:100-07.
13. Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113(2):278-83.
14. Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GV, Napimoga MH, Rosalen PL. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem.* 2013;61(19):4546.

15. Bueno-Silva B, Marsola A, Ikegaki M, Alencar SM, Rosalen PL. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. *Nat Prod Res.* 2017;31(11):1318.
  
16. Dantas Silva RP, Machado BA, Barreto GA, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, Carvalho AA, Padilha FF, Barbosa JD, µmsza-Guez MA. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One.* 2017;12(3):e0172585.
  
17. Bueno-Silva B, Kawamoto D, Ando-Suguimoto ES, Alencar SM, Rosalen PL, Mayer MP. Brazilian Red Propolis Attenuates Inflammatory Signaling Cascade in LPS-Activated Macrophages. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144954.
  
18. Markiewicz-Żukowska R, Car H, Naliwajko SK, Sawicka D, Szynaka B, Chyczewski L, Isidorov V, Borawska MH. Ethanolic extract of propolis, chrysin, CAPE inhibit human astroglia cells. *Adv Med Sci.* 2012;57(2):208-16.
  
19. Trusheva B, Popova M, Naydenski H, Tsvetkova I, Gregorio Rodriguez J, Bankova V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia.* 2004;75(7-8):683-89.

20. Lotti C, Campo Fernandez M, Piccinelli AL, Cuesta-Rubio O, Márquez Hernández I, Rastrelli L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric Food Chem.* 2010;58(4):2209-13.
21. Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M, Rastrelli L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2011;59(12):6484-91.
22. Freires IA, de Alencar SM, Rosalen PL. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem.* 2016;110:267.
23. Becerra TB, Calla-poma RD, Requena-Mendizábal MF, Millones-Gómez PA. Antibacterial effect of Peruvian propolis collected during different seasons on the growth of *Streptococcus mutans*. *Open Denti J.* 2019;13:2019:327.

24. Franchin M, C3lon DF, Castanheira FV, da Cunha MG, Bueno-Silva B, Alencar SM, Cunha TM, Rosalen PL. Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis Inhibits Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Elucidation of the Mechanism of Action. *J Nat Prod.* 2016 22;79(4):954.
25. Barbosa Bezerra G, de Menezes de Souza L, Dos Santos AS, de Almeida GK, Souza MT, Santos SL, et al. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent model. *Biomed Pharmacother.* 2017;85:687.
26. Zhang CP, Shen XG, Chen JW, Jiang XS, Wang K, Hu FL. Artepillin C, is it a good marker for quality control of Brazilian green propolis? *Nat Prod Res.* 2017;31(20):2441.
27. El-Guendouz S, Aazza S, Lyoussi B, Bankova V, Popova M, Neto L, et al. Moroccan Propolis: A Natural Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with No Induction of Resistance after Continuous Exposure. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018:9759240.

28. Popova M, Lyoussi B, Aazza S, Antunes D, Bankova V, Miguel G. Antioxidant and  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Properties and Chemical Profiles of Moroccan Propolis. *Nat Prod Commun.* 2015;10(11):1961.
29. Svečnjak L, Marijanović Z, Okińczyc P, Marek Kuś P, Jerković I. Mediterranean Propolis from the Adriatic Sea Islands as a Source of Natural Antioxidants: Comprehensive Chemical Biodiversity Determined by GC-MS, FTIR-ATR, UHPLC-DAD-QqTOF-MS, DPPH and FRAP Assay. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(4):337.
30. Hochheim S, Pacassa Borges P, Boeder AM. A Bioguided Approach for the Screening of Antibacterial Compounds Isolated From the Hydroalcoholic Extract of the Native Brazilian Bee's Propolis Using Mollicutes as a Model. *Front Microbiol.* 2020;11:558.
31. Touzani S, Embaslat W, Imtara H. In Vitro Evaluation of the Potential Use of Propolis as a Multitarget Therapeutic Product: Physicochemical Properties, Chemical Composition, and Immunomodulatory, Antibacterial, and Anticancer Properties. *Biomed Res Int.* 2019;2019:4836378.

32. Bonamigo T, Campos JF, Alfredo TM, Balestieri JB, Cardoso CA, Paredes-Gamero EJ, et al. Antioxidant, Cytotoxic, and Toxic Activities of Propolis from Two Native Bees in Brazil: *Scaptotrigona depilis* and *Melipona quadrifasciata anthidioides*. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1038153.
33. De Freitas MCD, de Miranda MB, de Oliveira DT, Vieira-Filho SA, Caligorne RB, de Figueiredo SM. Biological Activities of Red Propolis: A Review. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2017;11(1):3.
34. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Antimicrobial and Antibiofilm Activity against *Streptococcus mutans* of Individual and Mixtures of the Main Polyphenolic Compounds Found in Chilean Propolis. *Biomed Res Int*. 2019;2019:7602343.
35. Martins ML, Monteiro ASN, Guimarães JEC, Guimarães MBCT, da Silva RF, Cabral LM, et al. Cytotoxic and antibacterial effect of a red propolis mouthwash, with or without fluoride, on the growth of a cariogenic biofilm. *Arch Oral Biol*. 2019;107:104512.

36. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Evaluation of Alternative Methods to Assess the Biological Properties of Propolis on Metabolic Activity and Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. Evid Based Complement Alternat Med. 2019;2019:1524195.
37. Utispan K, Chitkul B, Monthanapisut P, Meesuk L, Pugdee K, Koontongkaew S. Propolis Extracted from the Stingless Bee *Trigona sirindhornae* Inhibited *S. mutans* Activity In Vitro. Oral Health Prev Dent. 2017;15(3):279-84.
38. Almuhayawi MS. Propolis as a novel antibacterial agent. Saudi J Biol Sci. 2020 Nov;27(11):3079-86.
39. Przybyłek I, Karpiński TM. Antibacterial Properties of Propolis. Molecules. 2019;24(11):2047.
40. Chen YW, Ye SR, Ting C, Yu YH. Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. J Food Drug Anal. 2018;26(2):761-68.

41. Lupatini NR, Danopoulos P, Swikidisa R, Alves PV. Evaluation of the Antibacterial Activity of Green Propolis Extract and Meadowsweet Extract Against *Staphylococcus aureus* Bacteria: Importance in Wound Care Compounding Preparations. *Int J Pharm Compd.* 2016;20(4):333-37.
42. Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol.* 2017;122(4):911-20.
43. Asawahame C, Sutjarittangtham K, Eitssayeam S, Tragoolpua Y, Sirithunyalug B, Sirithunyalug J. Antibacterial activity and inhibition of adherence of *Streptococcus mutans* by propolis electrospun fibers. *AAPS PharmSciTech.* 2015;16(1):182-191.
44. Cardoso JG, Iorio NL, Rodrigues LF. Influence of a Brazilian wild green propolis on the enamel mineral loss and *Streptococcus mutans* count in dental biofilm. *Arch Oral Biol.* 2016;65:77-81.

45. Martins ML, Leite KLF, Pacheco-Filho EF. Efficacy of red propolis hydro-alcoholic extract in controlling *Streptococcus mutans* biofilm build-up and dental enamel demineralization. Arch Oral Biol. 2018;93:56-65.
46. Zabaiou N, Fouache A, Trousson A, et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. Chem Phys Lipids. 2017;207(Pt B):214-222.
47. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. Biomed Pharmacother. 2018;98:469-83.
48. 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.
49. Abbasi AJ, Mohammadi F, Bayat M. Applications of Propolis in Dentistry: A Review. Ethiop J Health Sci. 2018;28(4):505-12.
50. Gutiérrez H, De la Vara R. Análisis y diseño de experimentos 2nd ed. México: Mc Granw Hill; 2008.

51. Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. Braz J Med Biol Res. 2018;51(6):e7118.
52. Nina N, Quispe C, Jiménez-Aspee F. Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from the Región del Maule, Central Chile. Molecules. 2015;20(10):18144.
53. Tugba Degirmencioglu H, Guzelmeric E, Yuksel PI, Kırmızıbekmez H, Deniz I, Yesilada E. A New Type of Anatolian Propolis: Evaluation of Its Chemical Composition, Activity Profile and Botanical Origin. Chem Biodivers. 2019;16(12):e1900492.
54. Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, et al. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Braz J Microbiol. 2013;44(2):577-85.

55. Balto HA, Al-Manei KK, Bin-Mohareb TM, Shakoor ZA, Al-Hadlaq SM. Cytotoxic effect of *Salvadora persica* extracts on human gingival fibroblast cells. Saudi Med J. 2014;35(8):810-15.
56. Verma UP, Gupta A, Yadav RK, Tiwari R, Sharma R, Balapure AK. Cytotoxicity of chlorhexidine and neem extract on cultured human gingival fibroblasts through fluorescence-activated cell sorting analysis: An in-vitro study. Eur J Dent. 2018;12(3):344-49.
57. Eldiniz AU, Mustafa K, Ørstavik D, Dahl JE. Cytotoxicity of resin, calcium hydroxide and silicone-based root canal sealers on fibroblasts derived from human gingiva and L929 cells lines. Int Endod J. 2007;40:329-37.
58. Santos FA, Bastos EM, Uzeda M, et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. J Ethnopharmacol. 2002;80(1):1-7.
59. Simões LM, Gregório LE, Da Silva Filho AA, et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. J Ethnopharmacol. 2004;94(1):59-65.

60. Yang H, Dong Y, Du H, Shi H, Peng Y, Li X. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules*. 2011;16(4):3444-3455.
61. Mancarz GF, Laba LC, da Silva EC. *Liquidambar styraciflua* L.: A new potential source for therapeutic uses. *J Pharm Biomed Anal*. 2019;174:422-31.
62. Voos AC, Kranz S, Tonndorf-Martini S. Photodynamic antimicrobial effect of safranin O on an ex vivo periodontal biofilm. *Lasers Surg Med*. 2014;46(3):235-43.
63. Millones-Gómez PA, Maurtua-Torres D, Bacilio-Amaranto R. Antimicrobial Activity and Antiadherent Effect of Peruvian *Psidium guajava* (Guava) Leaves on a Cariogenic Biofilm Model. *J Contemp Dent Pract* 2020;21(7):733–40.
64. Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto GA, Rebouças Silva J, da Silva DF, da Rocha JLC, et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*. 2018 4;13(12):e0207676.

65. Poggio C, Riva P, Chiesa M, Colombo M, Pietrocola G. Comparative cytotoxicity evaluation of eight root canal sealers. *J Clin Exp Dent*. 2017;9(4):e574-e578.
66. De Francisco LMB, Pinto D, Rosseto HC, De Toledo LAS, Dos Santos RS, Costa PJCD, et al. Design and characterization of an organo gel system containing ascorbic acid microparticles produced with propolis by-product. *Pharm Dev Technol*. 2020;25(1):54-67
67. Sánchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, León R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability, and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodontal Res*. 2011;46(2):252-60.
68. Lima BP, Shi W, Lux R. Identification, and characterization of a novel *Fusobacterium nucleatum* adhesin involved in physical interaction and biofilm formation with *Streptococcus gordonii*. *Microbiologyopen*. 2017;6(3):e00444.

69. Song Y, He JZ, Wang RK, Ma JZ, Zou L. Effect of SrtA on Interspecies Adherence of Oral Bacteria. *Curr Med Sci.* 2018;38(1):160-66.
70. Wu J, Yang Q, Jiang X, Fan Y, Zhang Y, Huang R. Oxyresveratrol promotes biofilm formation, cell attachment and aggregation of *Streptococcus gordonii* in the presence of sucrose. *FEMS Microbiol Lett.* 2020;367(12):fnaa090.
71. Guo L, Shokeen B, He X, Shi W, Lux R. *Streptococcus mutans* SpaP binds to RadD of *Fusobacterium nucleatum* ssp. polymorphum. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(5):355-64.
72. Barberá O, Sanz JF, Sánchez-Parareda, Marco A. Further flavonol glycosides from *Anthyllis onobrychioides*. *Phytochemistry.* 1986;25(10):2361–65.
73. Bashyal P, Parajuli P, Pandey RP, Sohng JK. Microbial Biosynthesis of Antibacterial Chrysoeriol in Recombinant *Escherichia coli* and Bioactivity Assessment. *Catalyst,* 2019;9(2):112.

74. Boué SM, Carter-Weintjes CH, Shih BY, Cleveland TE. Identification of flavone aglycones and glycosides in soybean pods by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography*.2009; A(991):61–8.
75. Justino GC, Borges CM, Florêncio MH. Electrospray ionization tandem mass spectrometry fragmentation of protonated flavone and flavonol aglycones: a re-examination. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009;23(2):237-48.
76. Kim SB, Lee T, Lee HS, Song CK, Cho HJ, Kim DD, Maeng HJ, Yoon IS. Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS method for the determination of acacetin in human plasma and its application to a protein binding study. *Arch Pharm Res*. 2016;39(2):213-20.
77. Li Y, Wang C, Li H, Yu T, Tan L. Simultaneous Determination of Formononetin, Calycosin and Rhamnocitrin from *Astragalus Complanatus* by UHPLC-MS-MS in Rat Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study. *J Chromatogr Sci*. 2016;54(9):1605-12.

78. Preindl K, Braun D, Aichinger G, Sieri S, Fang M, Marko D, Warth B. A Generic Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Exposome Method for the Determination of Xenoestrogens in Biological Matrices. *Anal Chem.* 2019;91(17):11334-42.
79. Silvestro L, Tarcomnicu I, Dulea C, Attili NR, Ciuca V, Peru D, Rizea Savu S. Confirmation of diosmetin 3-O-glucuronide as major metabolite of diosmin in humans, using micro-liquid-chromatography-mass spectrometry and ion mobility mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(25):8295-310.
80. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR, et al. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J Sci Food Agric.* 2020;100(4):1369-82.
81. Sánchez JP. Comparación de la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos, y su efecto antibacteriano frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [Tesis Pregrado]. Trujillo: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2018.

82. Ayala CI, Castillo EF, Graus L. Propóleo peruano en el desarrollo de un enjuague bucal con actividad antibacteriana. *Arnaldoa*. 2016; 23 (1): 171–84.
83. Cayo C, Quijandra L, Ramos J. In vitro evaluation of the antibacterial effect of Propolis on cultures of *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). *Ciencia y Desarrollo*. 2016; 19 (2):19-24.
84. Jacinto DD. Efecto antibacteriano entre tres concentraciones de extracto etanólico de propóleo de Cajabamba y un propóleo comercial, sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [Tesis Pregrado]. Trujillo: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2018.
85. Vargas V. Evaluación de la marcha fitoquímica de tres propóleos peruanos, y su actividad antibacteriana frente a cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus oralis* (ATCC 35037). [Tesis Pregrado]. Trujillo: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote; 2019.
86. Eguizábal M. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Odontol. Sanmarquina*. 2007; 10(2): 18-20.

87. Mayta FR, Sacsquispe S. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC25923). Rev Estomatol Herediana. 2010;20(1):19-24.
88. Huaytalla RM, Gálvez CM, Carhuapoma M, Alvarez MA, Lopez S. Efecto inhibidor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. Rev Estomatol Herediana. 2018; 28(1):36-43
89. Jara Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). [Tesis Pregrado]. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, 2015.
90. Sayas R, Huamán M. Determinación de la flora polinífera del valle de Oxapampa (Pasco-Perú) en base a estudios palinológicos. Ecol. apl. 2009;8(1):53-9.

91. Fernández-Calderón MC, Navarro-Pérez ML, Blanco-Roca MT, Gómez-Navia C, Pérez-Giraldo C, Vadillo-Rodríguez V. Chemical Profile and Antibacterial Activity of a Novel Spanish Propolis with New Polyphenols also Found in Olive Oil and High Amounts of Flavonoids. *Molecules*. 2020;25(15):E3318.
92. Okińczyc P, Paluch E, Franiczek R, Widelski J, Wojtanowski KK, Mroczek T, et al. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* L. and *Trigona* sp. propolis from Nepal and its phytochemical analysis. *Biomed Pharmacother*. 2020;25;129:110435.
93. Osés SM, Marcos P, Azofra P, de Pablo A, Fernández-Muñoz MÁ, Sancho MT. Phenolic Profile, Antioxidant Capacities and Enzymatic Inhibitory Activities of Propolis from Different Geographical Areas: Needs for Analytical Harmonization. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(1):75.
94. Palomino L., García C., Gil J., Rojano B., Durango D., Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia), *Vitae*, 2009;16(3): 388-95.

95. Narimane S, Demircan E, Salah A, Ozcelik BÖ, Salah R. Correlation between antioxidant activity and phenolic acids profile and content of Algerian propolis: Influence of solvent. *Pak J Pharm Sci.* 2017;30(4(Supl.)):1417-23.
96. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:595393.
97. Pobiega K, Kraśniewska K, Derewiaka D, Gniewosz M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J Food Sci Technol.* 2019;56(12):5386-95.
98. Santos LM, Fonseca MS, Sokolonski AR, Deegan KR, Araújo RP, Umsza-Guez MA, et al. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. *J Sci Food Agric.* 2020;100(4):1369-82.

99. Zeng ZP, Jiang JG. Analysis of the adverse reactions induced by natural product-derived drugs. *Br J Pharmacol.* 2010;159(7):1374-91.
100. Nani BD, Franchin M, Lazarini JG. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression of cancer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. *Phytother Res.* 2018;32(4):750-54.
101. Uğur Z, Akpınar E, Hepokur C, Erdönmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz. oral res.* 2018;32:e119.
102. Cabral I.S.R., Oldoni T.L.C., Prado A. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante de própolis vermelha brasileira. *Quim Nova.* 2009;32:1523–27.
103. Das Neves MV, da Silva TM, Lima Ede O, da Cunha EV, Oliveira Ede J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. *Braz J Microbiol.* 2016;47(1):159-66.

104. Li A, Xuan H, Sun A, Liu R, Cui J. Preparative separation of polyphenols from water-soluble fraction of Chinese propolis using macroporous absorptive resin coupled with preparative high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1012-1013:42-9.
105. Sha N, Huang HL, Zhang JQ, et al. Simultaneous quantification of eight major bioactive phenolic compounds in Chinese propolis by high-performance liquid chromatography. *Nat Prod Commun.* 2009;4(6):813-18.
106. Hall, C, Mah F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews* 2017;41(3):276-301.
107. Khatoon Z, McTiernan CD, Suuronen EJ, Mah TF, Alarcon EI. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon.* 2018;4(12):e01067.

108. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):563-75.
109. Walsh DJ, Livinghouse T, Durling GM. Novel Phenolic Antimicrobials Enhanced Activity of Iminodiacetate Prodrugs against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Chem Biol Drug Des.* 2020;00:1–14.
110. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:206439.
111. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* 2005;100(1-2):114-17.
112. Kowacz M, Pollack GH. Propolis-induced exclusion of colloids: Possible new mechanism of biological action. *Colloid Interface Sci Commun.* 2020;38:100307.

113. Galgowski C, Pavanelo Frare S, Rau M, Debiase Alberton M, Althoff S, Guedes A, et al. Mollicute Anti-Adhesive and Growth Inhibition Properties of the Methanolic Extract of Propolis from the Brazilian Native Bee *Melipona quadrifasciata*. *Chem Biodivers*. 2020;2(1) 11-17

## **VIII. Anexos**

## Anexo 1: Constancia de aprobación del comité de ética



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

### CONSTANCIA

El que suscribe, Vicerrector de Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, autoriza la realización del proyecto de código SIDISI **66846**, titulado "**Caracterización fotoquímica de seis propóleos peruanos y su efecto sobre el espesor y vitalidad celular de un modelo de biofilm creado in vitro**" a cargo del investigador principal **Pablo Millones Gómez**. Este proyecto ha sido revisado y aprobado por nuestro comité de ética y/o otras instancias de revisión, cumpliendo con los estándares de nuestra institución.

Lima, 15 de julio de 2016

  
\_\_\_\_\_  
Dr. ~~Ciro Magaña Vargas~~  
Vicerrector de Investigación

## Anexo 2: Constancia de Modificación del comité de ética



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Dirección Universitaria de  
**INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)**

### CONSTANCIA

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité institucional de ética en investigación aprobó de manera expedita la **ENMIENDA/MODIFICACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

**Título del Proyecto** : "Efecto antibacteriano de propóleos peruanos en un modelo de biofilm periodontal creado in vitro".  
**Código de inscripción** : 66846  
**Investigador principal** : Millones Gómez, Pablo Alejandro

La enmienda/modificación corresponde a los siguientes documentos:

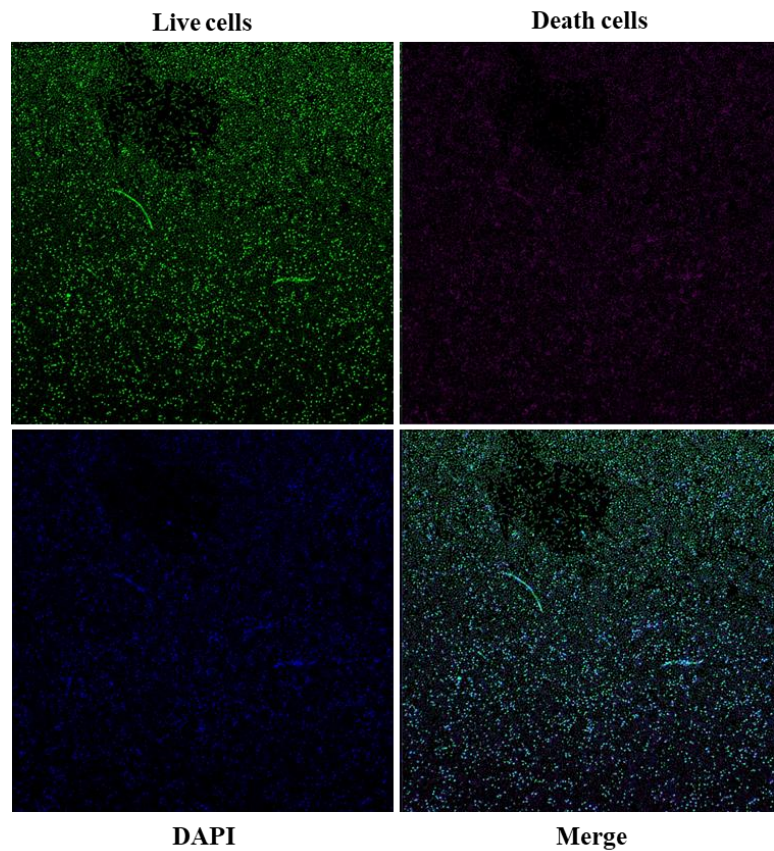
1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 05 de noviembre del 2019.

Lima, 06 de noviembre del 2019.

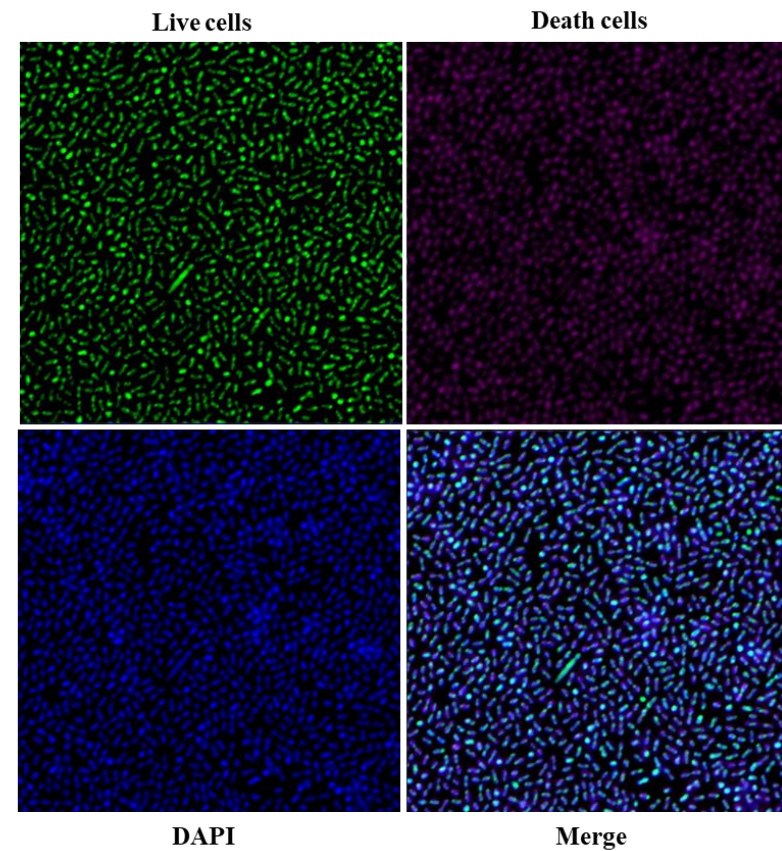
---

Dra. Frine Samalvides Cuba  
Presidenta  
Comité Institucional de Ética en Investigación

Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102   
Apartado postal 4314  
(511) 319-0000 anexo 201352   
duict@oficinas-upch.pe   
[www.cayetano.edu.pe](http://www.cayetano.edu.pe)

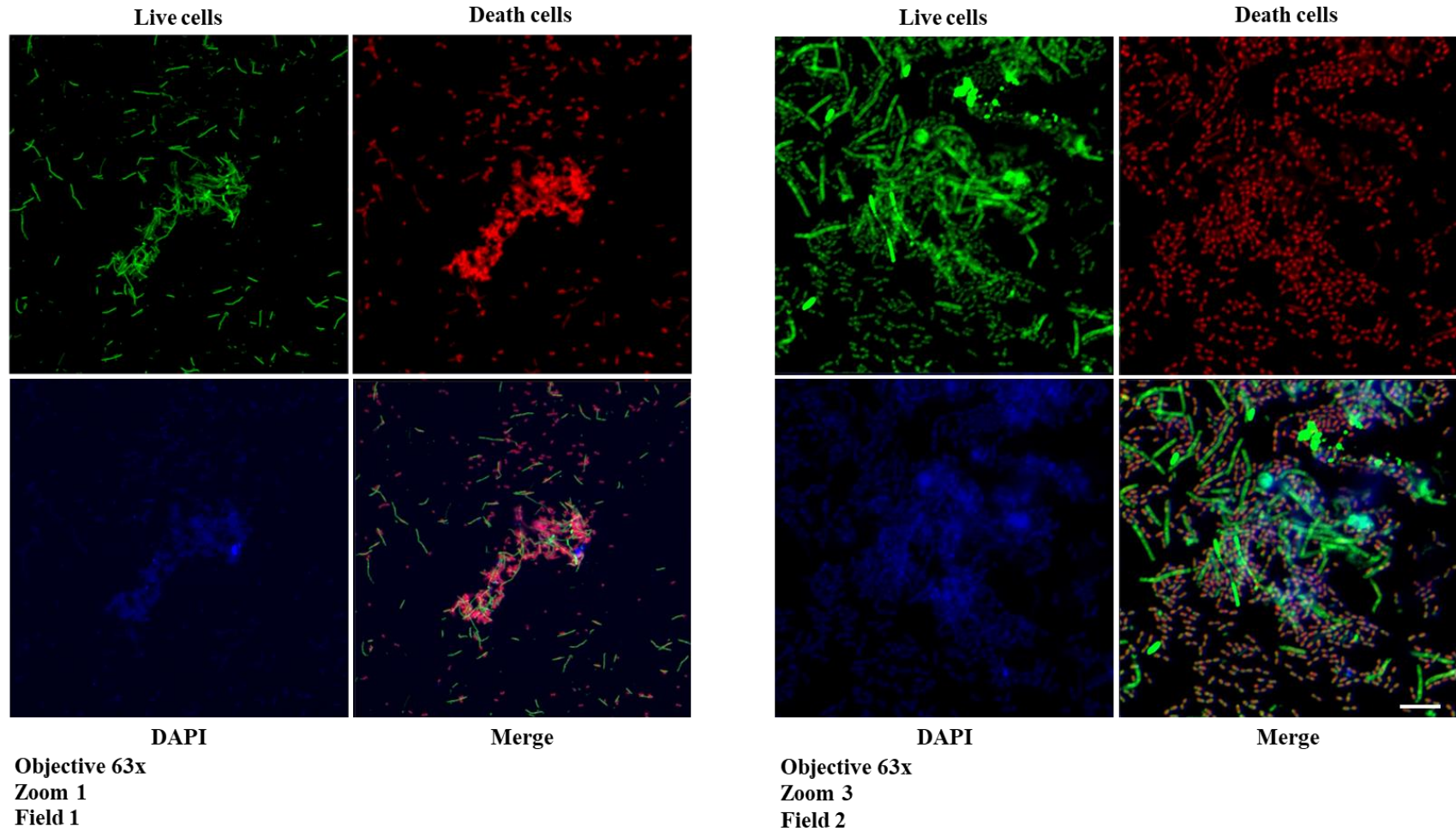


Objective 63x  
Zoom 1  
Field 1

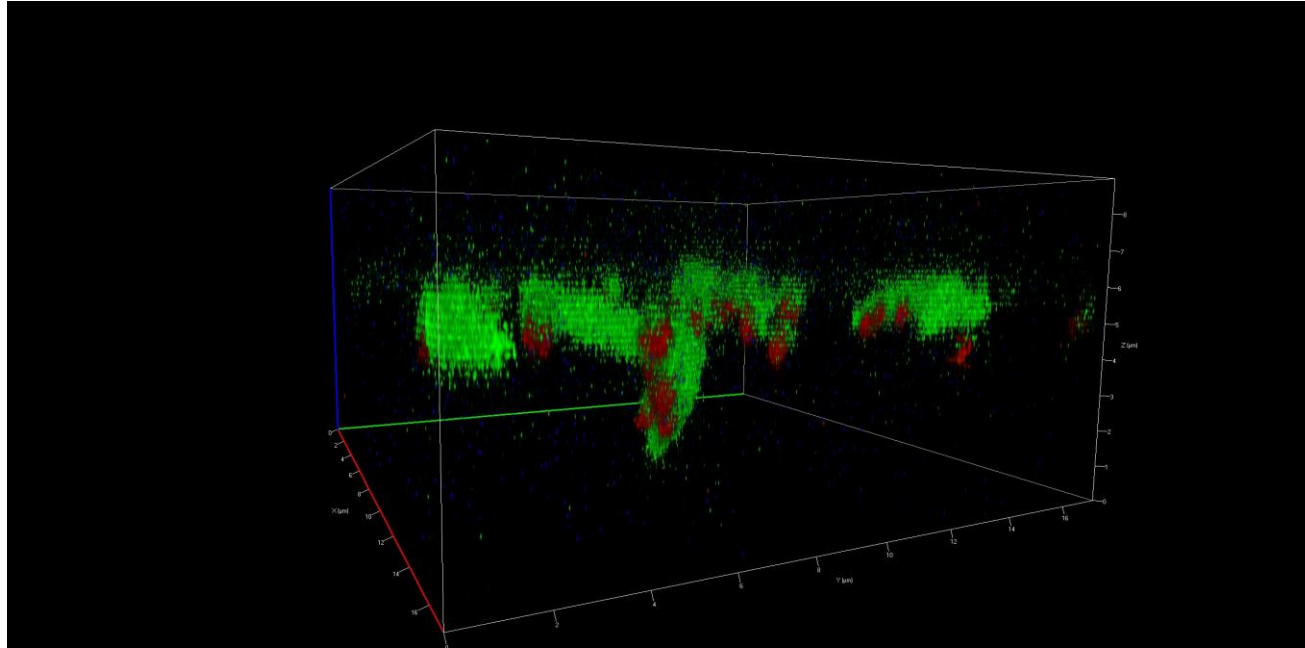


Objective 63x  
Zoom 4  
Field 1

*Imagen 1 y 2: Crecimiento del biofilm de S. gordonii ATCC® 51656™ y F. nucleatum ATCC® 10953™ a las 48 horas. Imágenes tomadas mediante microscopia confocal LSM 880 (Zeiss)*



***Imagen 3 y 4: Crecimiento del biofilm de *S. gordonii* ATCC® 51656™ y *F. nucleatum* ATCC® 10953™ a las 120 horas. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal LSM 880 (Zeiss)***



***Imagen 5: Crecimiento vertical del biofilm de S. gordonii ATCC® 51656™ y F. nucleatum ATCC® 10953™ a las 120 horas. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal LSM 880 (Zeiss)***