TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

"PERFIL FITOQUÍMICO Y POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DERIVADO DEL PROPÓLEO PERUANO CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*"

Tesis para optar el título profesional de:
CIRUJANO DENTISTA

Presentado por:

Andrea Yolanda Munsibay Foronda (0000-0001-6803-0749)

Pamela Leonor Espinoza Salas (0000-0002-9145-8169)

Asesora:

Cinthya Ruth Chipana Herquinio (0000-0002-6614-7211)

Lima – Perú

2024

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 20 de mayo de 2024.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Dr. Víctor Manuel Chumpitaz Cerrate	☒
Miembro: Lic. Elba Estefania Martinez Cadillo	
Miembro: Dra. Esperanza Raquel Ayón Haro	

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:
PERFIL FITOQUÍMICO Y POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DERIVADO DEL PROPÓLEO PERUANO CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Presentada por las estudiantes:

- Pamela Leonor Espinoza Salas
- Andrea Yolanda Munsibay Foronda

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesorada por: Mg. Esp. Cinthya Ruth Chipana Herquinio

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de los estudiante o egresados de la Carrera de Estomatología en la sustentación, concluyen de manera unánime (X) calificar a:

Tesista: Pamela Leonor Espinoza Salas Andrea Yolanda Munsibay Foronda		Nota (en letras): 16 (dieciséis)	
Aprobado ( )	Aprobado - Muy buena (X)	Aprobado - Sobresaliente ( )	Desaprobado ( )

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.



Dr. Víctor Manuel Chumpitaz Cerrate
Presidente del Jurado



Mg. Esp. Cinthya Ruth Chipana Herquinio
Asesora



Lic. Elba Estefania Martinez Cadillo
Miembro 1



Dra. Esperanza Raquel Ayón Haro
Miembro 2

ANEXO: FORMATO DE DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS / TRABAJO DE INVESTIGACIÓN[1]

Lima, 21 de mayo de 2024

Señor Doctor,
Carlos Zavalaga Reyes

Director General de Investigación, Desarrollo e Innovación
Universidad Científica del Sur
Presente. –

De nuestra consideración,

Andrea Yolanda Munsibay Foronda y Pamela Leonor Espinoza Salas egresadas de la Carrera de Estomatología de la Universidad Científica del Sur, en conjunto con el asesor/la asesora de tesis Cinthya Ruth Chipana Herquinio, declaramos que este informe final de tesis titulado: Perfil fitoquímico y potencial antibacteriano del extracto alcohólico derivado del propóleo peruano contra *Enterococcus Faecalis*, sustentado para obtener el título de Cirujano Dentista es original.

Es decir, no contiene plagio parcial ni total, cuando se utilizó información de fuentes externas se reconoció la autoría mediante la adecuada citación y los resultados obtenidos son producto entero de nuestra investigación y no han sido falseados ni fabricados. Todo esto en cumplimiento del Código de ética en la investigación, Reglamento del Comité de Integridad Científica, Reglamento de Propiedad Intelectual, Normas y procedimientos de los trabajos de investigación para la obtención de títulos profesionales y grados académicos [2], que afirmamos conocer en su totalidad.

Por ello, en caso de identificarse alguna situación de plagio, falsificación o fabricación de resultados, nos allanamos al proceso de investigación que establezca la Universidad y las posibles sanciones que pudieran surgir.

Firmamos en conformidad con lo declarado,



Firma tesista
DNI: 76423654
DNI: 73050730



Firma del asesor de tesis
DNI: 42400735

[1] En conformidad con la Resolución del Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD
[2] Los documentos están en: https://investigacion.cientifica.edu.pe/reglamentos/

INFORME DE REVISIÓN DE ORIGINALIDAD

Título del documento evaluado. Perfil fitoquímico y potencial antibacteriano del extracto alcohólico derivado del propóleo peruano contra *Enterococcus faecalis*

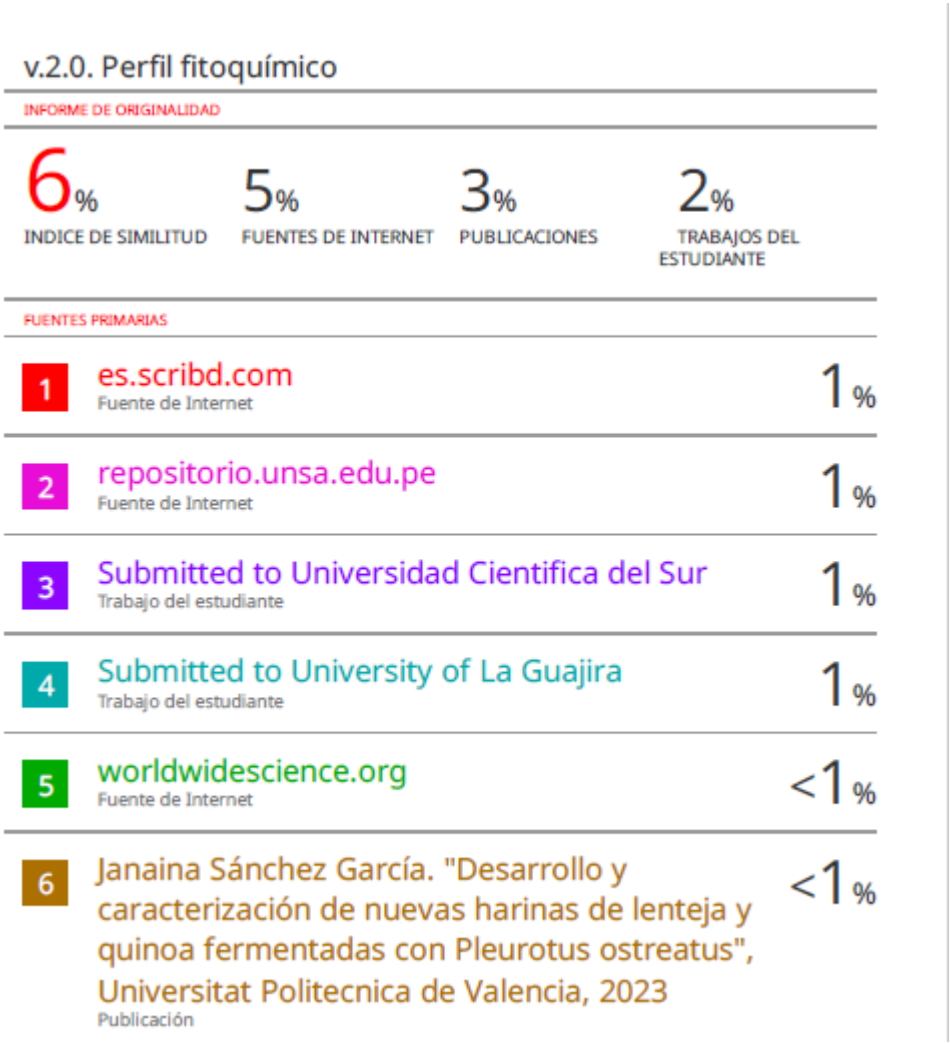
Autores. Pamela Leonor Espinoza Salas; Andrea Yolanda Munsibay Foronda

Mecanismo de revisión de originalidad. Evaluación con Turnitin (ID 2395491158).

Resultado de la evaluación. 6%

Revisado por. Magaly Kelly Guerrero Huaracallo.

Comentarios sobre la revisión. Filtros usados: excluir fuentes de menos de 12 palabras.



v.2.0. Perfil fitoquímico

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%	5%	3%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	es.scribd.com Fuente de Internet	1%
2	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	Submitted to Universidad Cientifica del Sur Trabajo del estudiante	1%
4	Submitted to University of La Guajira Trabajo del estudiante	1%
5	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1%
6	Janaina Sánchez García. "Desarrollo y caracterización de nuevas harinas de lenteja y quinoa fermentadas con Pleurotus ostreatus", Universitat Politecnica de Valencia, 2023 Publicación	<1%

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DEDICATORIA

El amor incondicional y los sacrificios de nuestros queridos padres fueron la fuerza que nos llevó a este triunfo. Este logro no solo es nuestro, sino también de ellos.

Nuestros respetados profesores y asesores, gracias por ser pilares fundamentales en nuestra formación académica. Apreciamos sus enseñanzas y motivación constante hacia la excelencia.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

AGRADECIMIENTOS

Le dedicamos nuestro agradecimiento a la doctora Cinthya Chipana por su continuo respaldo en esta investigación. Su excepcional asesoría, dedicación y paciencia han sido elementos fundamentales en la construcción de nuestro trabajo.

Agradecemos al Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Investigación Social e Interculturalidad en Salud por donar el propóleo y al doctor Gabriel Nima por su invaluable contribución en la obtención de la bacteria y su experta supervisión en el análisis estadístico de esta investigación.

También deseamos reconocer la destacada labor de la químico farmacéutica Mg. Amanda Lovera, cuyo constante apoyo en el ámbito del screening fitoquímico y su supervisión en el desarrollo de la investigación han sido esenciales.

Agradecemos al biólogo Raúl Olaechea por su apoyo y enseñanzas en el cultivo de incubación de bacterias, su valiosa contribución ha sido crucial para el progreso y comprensión de nuestro estudio.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ÍNDICE

		Pág.
	Título	1
	Resumen	2
	Abstract	3
	Versión en inglés	
I.	Introduction	4
II.	Materials y methods	6
III.	Results	15
IV.	Discussion	16
V.	Conclusions	20
VI.	Tables and figures	21
	Versión en español	
I.	Introducción	23
II.	Materiales y métodos	25
III.	Resultados	33
IV.	Discusión	34
V.	Conclusiones	38
VI.	Tablas y figuras	39
VII.	Referencias bibliográficas	41
VIII.	Anexos	43

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ARTÍCULO ORIGINAL ENVIADO A PUBLICAR

TÍTULO EN ESPAÑOL

«PERFIL FITOQUÍMICO Y POTENCIAL ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DERIVADO DE UN PROPÓLEO PERUANO CONTRA *ENTEROCOCCUS FAECALIS*»

TÍTULO EN INGLÉS

"PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF ALCOHOLIC EXTRACT DERIVED FROM PERUVIAN PROPOLIS AGAINST *ENTEROCOCCUS FAECALIS*"

Andrea Munsibay[1], Pamela Espinoza[1], Cinthya Chipana[1], Amanda Lovera[2,3], Raúl Olaechea[4] y Gabriel Nima[1]

1. Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de Estomatología, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.
2. Facultad de Ciencias de la Salud, Carrera de Farmacia y Bioquímica, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.
3. Instituto Nacional de Salud - Centro Nacional de Investigación Social e Interculturalidad en Salud, Lima, Perú.
4. Laboratorio de Microbiología Molecular y Genómica Bacteriana, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

Correspondence: Gabriel Nima

Email: gnima@cientifica.edu.pe

Conflicts of interest: The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

Acknowledgment: This study was used by AM and PE as a requirement to obtain the title of Dentist Surgeon. The authors would like to thank the "Universidad Científica del Sur" for providing facilities for the utilization of the "Natural Products Chemistry and Biochemistry Laboratory" and the "Laboratory of Microbiology and Molecular Genetics" for this research.

Funding: Study funded by the Universidad Científica del Sur through internal funds undergraduate (No. 012-DGIDI-CIENTÍFICA-2021).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo obtener un extracto alcohólico de propóleo (PAE), analizar su perfil fitoquímico y probar su actividad antibacteriana contra *Enterococcus faecalis* para demostrar su uso potencial en tratamientos pulpares para dientes primarios. El PAE fue obtenido mediante maceración con alcohol absoluto. El ensayo de solubilidad y el perfil fitoquímico fueron realizados. Los compuestos fenólicos y flavonoides fueron cuantificados mediante métodos de espectrofotometría. La actividad antibacteriana de PAE se evaluó mediante la concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (CMB) contra *E. faecalis*. Dos pastas experimentales intracanal a base de propóleo con propilenglicol fueron fabricados y comparados con la pasta triple antibiótica mediante el método de difusión en pozos de agar contra *E. faecalis*. Se analizaron los resultados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis (α=0.05). La prueba de solubilidad mostró que el etanol era el mejor disolvente para PAE. El perfil fitoquímico indicó que PAE contiene taninos, alcaloides, flavonoides, antocianidinas, aldehídos, glucósidos, cetonas, triterpenoides, esteroides y catequinas. El contenido de compuestos fenólicos y flavonoides fue de 49,8 ± 0,13 mg/ml equivalente de ácido gálico (EAG) y 0,824 ± 0,03 mg/ml equivalente de quercetina (EQ), respectivamente. Los resultados del PAE fueron observados mediante el MIC y MBC con valores de 60 mg/ml y 130 mg/ml, exhibiendo actividad antibacteriana contra *E. faecalis.* El ensayo de difusión en pozo de agar demostró que la pasta a base de propóleo tiene actividad antibacteriana. Sin embargo, la pasta triple antibiótica mostró una actividad antibacteriana superior contra *E. faecalis*. Los resultados indicaron que PAE tiene un alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides con actividad antibacteriana contra *E. faecalis*.

***Palabras clave*:** *Enterococcus faecalis*, propóleo, flavonoides, agentes antibacterianos, agentes de pulpectomía y recubrimiento pulpar dental.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ABSTRACT

This study aimed to obtain a propolis alcoholic extract (PAE), analyze its phytochemical screening, and test its antibacterial activity against *Enterococcus faecalis* to demonstrate its potential usage in pulp treatments for primary teeth. PAE was obtained by maceration with absolute alcohol. The solubility assay and a phytochemical screening were performed. The phenolic compounds and flavonoids were quantified using spectrophotometry methods. The antibacterial activity of PAE was assessed through minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) against *E. faecalis*. Two intracanal experimental propolis-based pastes were fabricated with propylene glycol and compared with the triple antibiotic paste (TAP) through the agar-well diffusion method against *E. faecalis*, and the results were analyzed using the Kruskal-Wallis test (α=0.05). The solubility test showed that ethanol was the best solvent for PAE. The phytochemical screening indicates the presence of tannins, alkaloids, flavonoids, anthocyanidins, aldehydes, glycosides, ketones, triterpenoids, steroids, and catechins in PAE. The phenolic compounds and flavonoid content were 49.8 ± 0.13 GAE mg/ml and 0.824 ± 0.03 QE mg/ml, respectively. The results showed that PAE has antibacterial activity against *E. faecalis* with MIC and MBC values of 60 mg/ml and 130 mg/ml, respectively. The agar well diffusion assay showed that the propolis-based paste has antibacterial activity. However, the triple antibiotic paste exhibited superior antibacterial activity against *E. faecalis.*

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Propolis, Flavonoids, Anti-bacterial agents, Dental pulp capping and pulpectomy agents

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

VERSIÓN EN INGLÉS

I. INTRODUCTION

Pediatric pulp problems represent a common challenge in pediatric dentistry, presenting unique considerations distinct from those in adult patients (1). Pulp therapy often involves addressing issues such as root resorption, inadequate bone support, periodontal complications, presence of permanent tooth germs, and challenges related to patient cooperation (2,3). Given the crucial role of primary dentition in the development of occlusion, the focus of pulp therapy is oriented toward preserving primary teeth to ensure an optimal eruption sequence (4).

An approach for pulp therapy in primary teeth is the "Lesion Sterilization and Tissue Repair" (LSTR) technique. This technique involves minimal or non-instrumentation, followed by the application of a mixture of antibiotics in a vehicle, such as propylene glycol, in the root canal system (4,5). The LSTR technique allows the sterilization of the root canal system by significantly reducing microbial load, promoting tissue repair, and preventing the premature loss of primary teeth, thereby creating a favorable environment for natural tissue healing. In recent years, LSTR has gained attention for its potential to facilitate dentin remineralization and support the natural healing process in pediatric patients (5,6). The most common medicament used in LSTR is the triple antibiotic paste, which combines metronidazole, ciprofloxacin, and minocycline (7,8).

The combination of antibiotics in triple antibiotic paste guarantees a broad spectrum of action for sterilization of the primary teeth root canal system (9). Metronidazole exhibits antibacterial activity against anaerobic bacteria, minocycline acts as a bacteriostatic

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

agent with activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, while ciprofloxacin demonstrates high activity, particularly against gram-negative bacteria (9–11). In recent years, there has been an increasing interest in using natural products in the biomedical field due to their antimicrobial properties, with propolis particularly.

Propolis is a sticky natural substance obtained by bees from flower resin, tree leaves, and plants mixed with their saliva (12,13). Propolis is a complex natural product comprising 30% wax, 50% resin, and plant balsam; 10% essential and aromatic oils; 5% pollen; and other substances imbued with the aroma of poplar, honey, and vanilla (14). Numerous studies have linked the antimicrobial activity of propolis to the flavonoids and phenolic compounds present in its composition (13,15,16). Multiple investigations have demonstrated propolis's effectiveness in exhibiting antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*, a bacterium that often proves challenging in the context of pulp infections (17,18). However, there is a lack of information regarding the use of propolis as a paste in the LSTR technique.

Thus, the purpose of this study was to obtain an alcoholic propolis extract, analyze its phytochemical profile, and test its antibacterial activity against *E. faecalis* to demonstrate its potential usage in pulp treatments for primary teeth. The hypotheses tested were that: (i) the alcoholic extract of propolis would indeed have phenolic compounds and flavonoids content, (ii) the alcoholic extract of propolis would have antimicrobial activity against *E. faecalis*, and (iii) there would be no differences among the alcoholic extract of propolis and the triple antibiotic paste, as an intracanal medicament regarding their antibacterial activity against *E. faecalis*.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

II. MATERIALS Y MÉTHODS

2.1 Propolis sample and preparation of ethanolic extract

The propolis was donated by the National Institute of Health-National Center for Social Research and Interculturality in Health, Lima, Peru; The propolis comes from the city of Tarapoto, province of San Martín, Peru, and was stored at 4 °C. No special permit was required for the collection of propolis. The alcoholic extract of propolis was made in the "Laboratory of Chemistry and Biochemistry of Natural Products" of Universidad Cientifica del sur in Lima, Peru.

The collected propolis (200 g) was ground manually and 96% ethanol was placed in a flask to obtain a 10% w/v solution. The solution was then subjected to an orbital shaker (ORBIT 1000, Labnet International, Edison, NJ, USA) at 25 °C and 200 rpm for 3 h and protected from light. The mash was filtered through the filter paper and stored for 7 days at room temperature under dark conditions; This extraction process was repeated twice.

The supernatant was carefully removed with a pipette, filtered through filter paper, ethanol was removed on a rotary evaporator (RV 10C, IKA-Werke GmbH, Staufen, Germany) (20 rpm, 100 bar, 40 °C, 4 hours). The extract was collected and placed in a glass container, subsequently stored (40 °C for 24 h) to ensure removal of the solvent. Finally, a high viscosity resin was obtained and stored at 4 °C until use.

2.2 Bacterial strain and growth conditions

The experiments were conducted using *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtained

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

from the "Laboratory of Microbiology and Molecular Genetics" at the Universidad Científica del Sur in Lima, Peru. A bacterial culture was obtained, which was previously stored at -80°C in brain heart infusion (BHI) medium with 20% glycerol (19). For reactivation, 50 µL of the glycerol solution was streaked on a Petri dish with BHI agar and incubated for 24 hours at 37°C. The purity of the culture was confirmed using the Gram staining method.

2.3 Solubility assay of propolis extract

A solubility test was performed to identify the optimal solvent for the propolis extract. One milligram of the alcoholic extract was diluted in one milliliter of nine different solutions: water, 70% alcohol, 96% alcohol, acetonitrile, dichloromethane, chloroform, methanol, 10% sodium hydroxide, and 10% hydrochloric acid. Subsequently, each tube was placed in a vortex shaker at 4200 rpm for 60 seconds.

2.4 Phytochemical screening

a. Test for protein

Ninhydrin test. One milliliter of propolis alcoholic extract (PAE) was stirred with 2 milliliters of ninhydrin reagent. The mixture was then boiled for a few minutes. The formation of a blue color implies the presence of proteins.

Biuret test. One milliliter of PAE was mixed with 1 milliliter of biuret reagent. The development of a violet color indicates the presence of a peptide linkage.

b. Test for glycosides

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Molisch's test. Two milliliters of PAE, 1 milliliter of Molisch's reagent, and a few drops of sulfuric acid were combined and mixed in a test tube. The formation of a purple or purplish-red ring confirms the presence of carbohydrates.

Feling's test. Feling's A reagent (1 ml) and Feling's B reagent (1 ml) were added to a test tube, shaken, and then kept in a water bath. After 1 minute, 1 milliliter of PAE was added and maintained in a water bath for 10 minutes. The appearance of a reddish-brown precipitate confirms the presence of reducing sugars.

Kedde's test. Kedde's A reagent (1 ml), Kedde's B reagent (1 ml), and PAE (1 ml) were combined in a test tube, shaken for 30 seconds. The formation of a blue-violet color in the following 2 hours confirms the presence of cardiac glycosides.

c. Test for resins

One milliliter of PAE and 5 milliliters of distilled water were mixed in a test tube. The formation of precipitate at the bottom implies the presence of resins.

d. Test for lipids

Sudan test. One milliliter of PAE and 1 milliliter of Sudan III dye were combined in a test tube. The mixture was kept in a water bath until solvent evaporation. The appearance of a red color confirms the presence of lipids.

Liebermann–Buchart test. One milliliter of PAE was placed in a test tube and kept in a water bath until solvent evaporation. The extract was dissolved in chloroform, a few drops of sulfuric acid were added, and mixed carefully. The formation of a green or green-blue color confirms the presence of triterpenes and steroids.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

e. Test for phenols

Gelatin test. One milliliter of PAE was combined with 1 milliliter of gelatin solution and shaken. The appearance of a white precipitate confirms the presence of phenols.

f. Test for alkaloids

Dragendorff's test. One milliliter of PAE was heated in a water bath for solvent evaporation. The extract was dissolved in 1 milliliter of 1% hydrochloric acid, and six drops of Dragendorff's reagent were added. The formation of an orange-red precipitate indicates the presence of alkaloids.

Mayer's test. One milliliter of PAE was heated in a water bath for solvent evaporation. The extract was dissolved in 1 milliliter of 1% hydrochloric acid, and six drops of Mayer's reagent were added. The presence of a whitish or cream precipitate indicates the presence of alkaloids.

g. Tests for flavonoids

Shinoda's test. One milliliter of PAE with 1 milliliter of concentrated hydrochloric acid were mixed in a test tube. A small magnesium ribbon was added to the solution, followed by 1 milliliter of amyl alcohol. The formation of pink coloration indicates the presence of flavonoids.

h. Test for anthocyanin.

Amylic test. One milliliter of PAE was mixed with 0.5 mL of concentrated hydrochloric acid in a test tube and kept in a water bath for ten minutes. After cooling, 0.5 mL of

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

distilled water and 1 mL of amyl alcohol were added. The mixture was stirred thoroughly. The formation of red or brown coloration indicates the presence of anthocyanin.

i. Test for aldehyde and ketone

Tollens' test. One milliliter of PAE with 1 milliliter of Tollens' reagent was combined in a test tube and heated in a water bath. The formation of a silver-mirror precipitate indicates the presence of aldehydes.

j. Test for saponins

Foam test. One milliliter of PAE was heated in a water bath until solvent evaporation. The extract was vigorously agitated with 2 milliliters of water for three minutes and inspected for foam formation. If the foam produced persists for 10 minutes, it indicates the presence of saponins.

k. Test for quinone

Bornträger reaction. One milliliter of PAE was placed into a test tube and heated in a water bath for solvent evaporation. Subsequently, the extract was dissolved in chloroform, and 1 milliliter of Bornträger's reagent was added. The formation of a red coloration indicates the presence of quinone.

l. Test for catechin

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Two drops of PAE were applied to filter paper along with a few drops of sodium carbonate solution. The paper was then exposed to UV light. The presence of a green stain under UV light confirms the presence of catechin.

2.5 Total content analysis of phenolic compounds

The Folin-Ciocalteu's reagent method was conducted to determine the phenolic content of the propolis alcoholic extract (PAE). Propolis samples were prepared with 0.2 ml of PAE (26.1 mg/ml), 1 ml of Folin-Ciocalteau reagent, 0.5 ml of anhydrous sodium carbonate, and 0.9 ml of distilled water, resulting in a final volume of 2.6 ml. The mixture was then incubated for 30 minutes at room temperature in dark conditions. Following incubation, the total content of phenolic compounds was measured at 765 nm against the blank solution, utilizing a UV/Vis Spectrometer (Genesys 10 UV, Thermo Scientific, Rochester, NY, USA).

A similar procedure was replicated using aliquots of 10, 25, 50, and 100 µl of a gallic acid solution (10 mg) to construct the gallic acid standard calibration curve. Ultimately, the total content of phenolic compounds was evaluated against the gallic acid standard calibration curve and expressed in milligrams of gallic acid equivalent per gram of PAE (mg GAE/g of PAE), determined according to the regression equation: $y = 0.0098x - 0.0035$ with $R^2 = 0.999$. Three independent experiments were conducted.

2.6 Total flavonoid content analysis

The flavonoid content of the PAE was determined using quercetin as a reference standard. Propolis samples were prepared using PAE (26.1 mg/ml) diluted in 96% ethanol to achieve a concentration of 0.605 mg/ml. The total flavonoid content was

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

measured at 725 nm against the blank solution, utilizing a UV/Vis Spectrometer.

A similar procedure was repeated to obtain three quercetin standards with final concentrations of 0.3, 0.2, and 0.1 mg/ml using 96% ethanol as a solvent to construct the quercetin standard calibration curve. Finally, the total content of flavonoid compounds was evaluated against the quercetin standard calibration curve and expressed in mg of quercetin equivalent per gram of PAE (mg QE/g of PAE), obtained according to the regression equation: y= 0.0445x + 0.109 with R^2= 0.9906. Three independent experiments were performed.

2.7 Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

For the experiments, 1 gr of PAE was diluted in 2 ml of 70% ethanol through low-speed centrifugation (430 rpm) for 3 minutes. Subsequently, the solution was passed through a filter (0.22 µm pore size filter) and stored in an amber glass bottle at 4 ºC until usage.

The antimicrobial activity of PAE against *E. faecalis* was evaluated by determining its Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Cultures of *E. faecalis* were grown in BHI medium (14 h, 37°C). Microbial cells were resuspended in a saline solution and adjusted to 0.5 on the McFarland scale.

To determine the MIC, PAE was serially diluted from 150 to 40 mg/ml in BHI medium in a 96-well plate (100 µl). Then, 100 µl of the adjusted inoculum was added to each well, and all the plates were incubated (24 h, 37°C). After incubation, the row of wells with the lowest dilution showing no turbidity was defined as the MIC. To confirm the results of the visual method, 50 µl of resazurin (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) (0.1%)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

was added to each well. After further incubation (30 min, 37°C) in dark conditions, the plates were visually re-inspected. The color change from purple to pink was considered as positive bacterial growth.

To determine the MBC, 10 µl of each well was plated in triplicate on BHI agar plates and incubated (37°C, 24h) to observe bacterial growth. Three independent experiments were performed for MIC and MBC.

2.8 Agar well diffusion assay

To evaluate the antimicrobial activity of PAE, a diffusion sensitivity test was conducted using the agar well diffusion assay. Two experimental intracanal pastes based on PAE were prepared with propylene glycol as a vehicle. The concentration of the experimental pastes was determined using the results of the MIC and MBC assays. One paste was formulated using the MBC concentration, while the other was prepared at a concentration approximately 50% higher than the MBC. These pastes were compared with the triple antibiotic paste (positive control) and propylene glycol (negative control).

A bacterial culture of *E. faecalis* was prepared as described previously. An aliquot of the bacterial culture (50 µl) was spread on the surface of a Petri dish (n=5) containing BHI agar using a sterilized Drigalski spatula. After 5 minutes, four wells (4 mm deep and 5 mm diameter) were cut in the agar for each paste. Then, 50 µl of each paste was added to the wells using a sterile spatula. Finally, the plates were incubated at 37 °C for 24 hours.

The preparation of the experimental pastes was as follows:

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

The triple antibiotic paste: Ciprofloxacin (Clorfex 500mg, INRETAIL PHARMA S.A, Madrid, España InRetail Pharma, Spain, Madrid), minocycline (Acnebiot 100mg, INRETAIL PHARMA S.A., Madrid, EspañaInRetail Pharma, Spain, Madrid), and metronidazole (Flagimed 500mg, INRETAIL PHARMA S.A, Madrid, EspañaInRetail Pharma, Spain, Madrid); vehicle: propylene glycol (Farmacia Universal, Lima, Peru) antibiotics were mixed in a 1:1:1 ratio, following the method proposed by Hoshino et al. (7)

PAE and propylene glycol were measured using micropipettes (ISOLAB, Laborgerate GmbH, Eschau, Germany), while antibiotics were weighed using an analytical balance (Pioneer Analytical PX224, Ohaus, Parsippany, NJ, USA). All experimental pastes were freshly prepared before use.

After incubation, antibacterial activity was determined by measuring the bacterial growth inhibition zone around the wells in millimeters, calculated as the shortest distance between the well margin and the initial bacterial growth (Fig 2). Each Petri dish was photographed individually with a cell phone camera and images were transferred to the open access software ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). It was calibrated by drawing a line on a reference object, which was a ruler placed on the image. Then a line was drawn that covered the width of the inhibition zone and its measurement in millimeters was subsequently analyzed. (20) The agar well diffusion method was carried out three times.

2.9 Statistical analysis

The data from the agar well diffusion assay was tested for normality and homogeneity of variances using the Shapiro-Wilk and Bartlett tests (α=0.05). The results indicated that

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

the data did not follow a normal distribution ($p<0.05$). Subsequently, a Kruskal-Wallis test ($\alpha=0.05$) was employed to analyze statistical differences between groups. The data analysis was conducted using STATA 17.0 (Stata Corporation, Texas, USA).

III. RESULTS

The solubility of propolis was tested in water and various organic solvents, with the results presented in Table 1. The results indicated that propolis exhibited the highest solubility in 96º ethanol, dichloromethane, and methanol. In contrast, no solubility was observed in sodium hydroxide (10%) and hydrochloric acid (10%).

Phytochemical screening of the propolis extract involved testing for 16 chemical compounds. The reactions with various reagents revealed the presence or absence of the investigated compounds, as presented in Table 2. Phytochemical screening identified lipids, tannins, and phenolic compounds, including flavonoids, among other compounds. Conversely, amino acids, saponins, and quinones, among others, were not detected. Phenolic compounds content was determined to be 49.8 ± 0.13 GAE mg/ml of PAE and 0.824 ± 0.03 QE mg/ml of PAE for flavonoids (Fig. 1).

The antimicrobial properties of the propolis extract against *E. faecalis* were investigated, determining the MIC at 60 mg/ml and the MBC at 130 mg/ml. The agar well diffusion assay revealed a potent bacterial effect of the triple antibiotic paste, with statistically significant differences compared to both 200 mg/ml and 130 mg/ml propolis-based pastes. No statistical differences were observed between the formulations. of pasta containing propolis (Table 3).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

IV. DISCUSSION

Propolis is a resinous substance produced by bees, created through the mixture of saliva, beeswax, and plant buds (12,13). It possesses various properties, including anti-tuberculosis (21), anti-inflammatory (12,22), antiviral (12,23), and antioxidant (12,24,25), with several studies demonstrating its antibacterial activity (13,26–29). In this study, an ethanolic propolis extract (PAE) was prepared, followed by a phytochemical analysis, determination of minimum inhibitory concentration (MIC), and minimum bactericidal concentration (MBC), along with an agar well diffusion assay. The results revealed a high concentration of phenolic compounds and flavonoids in the propolis extract, demonstrating its antibacterial efficacy against *E. faecalis*.

The solvent used to prepare the PAE could influence its biomedical properties (16,25). In this study, ethanol was used as the solvent for propolis extraction, instead of other solvents. Previous studies have highlighted the efficacy of ethanol in dissolving various compounds found in propolis, such as phenolic compounds and flavonoids, establishing it as the gold standard (29–32). Additionally, a solubility test was conducted in this study, revealing that 96% ethanol, dichloromethane, and methanol were effective in dissolving the propolis extract. Ethanol was chosen as a solvent due to several advantages over other solvents; it is easy to evaporate without altering the extracted compounds, it is considered safe, its reasonable cost, and has the potential to enhance the antibacterial activity of the propolis extract (31,32). Despite ethanol's effectiveness, concerns about its use, especially in pregnant and breastfeeding women, children, and certain special patient populations, have led researchers to investigate for alternative solvents (29,33).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

The properties of propolis are intricately linked to the bee race, geographical area of resin collection, botanical source (34,35), and even the season of collection (13,36), leading to variability in its bioactive compounds. A study compared the antioxidant activity of propolis samples originating from distinct geographical regions and plant sources; demonstrating that the propolis's antioxidant activity is correlated with both its origin and its phenolic compounds (35). Another study investigated the antibacterial, antibiofilm, cytotoxic activities, and chemical compositions of 13 Peruvian propolis samples against oral biofilms, revealing variations in antibacterial activity and demonstrating differences in bioactive compounds (34). The propolis used in this study was collected from Tarapoto City, San Martín province, Peru, where the flora is responsible for the concentration of bioactive compounds found in the extract used in this research.

In this study, the phytochemical analysis of PAE revealed the presence of alkaloids, resins, aldehydes, ketones, triterpenes, steroids, phenols, and flavonoids. The combination of these and other compounds is responsible for the bioactive properties of propolis and is directly related to the factors mentioned previously (24). Additionally, the lack of standardized methods and analyses to evaluate its composition complicates the understanding of its bioactive properties and the compounds related to each of them even more (37).

The results revealed that PAE contains phenolic compounds and flavonoids in its composition. In this way, the initial hypothesis was confirmed, which stated that the alcoholic extract of propolis would contain phenolic compounds and flavonoids. These phenolic and flavonoid compounds exhibit various therapeutic properties and

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

demonstrate strong antibacterial activity, which could be considered an indicator to evaluate the quality of propolis (25,35,38). Phenolic compounds also manifest antioxidant properties, effectively combating oxidative stress and inflammation (16,26). Furthermore, flavonoids, as a subclass of phenolic compounds, exhibit remarkable antibacterial activity by disrupting bacterial cell membranes and inhibiting microbial growth (18).

There are mechanisms of action for the antibacterial activity of propolis such as inhibition of nucleic acid synthesis, alteration of the function of the cytoplasmic membrane, inhibition of energy metabolism, reduction of affinity for the development of biofilms, inhibition of cell membrane proteins and increased membrane permeability (39). The mechanism of action varies depending on the composition, structure and bacteria (40). Therefore, there is no single established mechanism (41). Their collective action offers a natural alternative to conventional antibiotics (29), highlighting the importance of quantifying them in the propolis extract to evaluate its antibacterial activity.

In this study, variations in PAE phenolic and flavonoid compounds were noted (Fig. 1), as expected due to differences in the phytochemical profile related to season, collection location, and extraction methods (26). Hernandez et al. found a wide variability in phenolic compounds (from 68 to 500 EQ mg/g) and flavonoids (caffeic acid equivalents from 13 to 379 mg/g) in PAE (38). Another study on propolis from Poland showed a high variability in the content of phenols (from 116.16 to 219.41 EAG mg/g) and flavonoids (from 29.63 to 106.07 EQ mg/g) (42). According to Paula et al., the propolis analysis method also affects the variability in the compounds found in the literature (43).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Therefore, there is no universally accepted minimum level for these compounds in propolis.

Previous studies revealed MIC values between 2 µg/ml and 1000 µg/ml (27,28), in this research the result of MIC (60 mg/ml) exhibits antibacterial activity against E. Faecalis, it is in the intermediate range. The MIC values can be attributed to the methodology, experimental design and origin of the propolis. Propylene glycol is used as a vehicle in endodontics. It is colorless, with a mild pungent odor and sweet taste. In addition to demonstrating germicidal efficacy, it has the potential to prevent and treat microbial infections. Compared to other vehicles, it has low cytotoxicity. Its antibacterial properties allow sustained release of the drug, and its low surface tension gives it the advantage of being penetrable through the dentinal tubules (44).

The agar diffusion test showed reduced antibacterial activity for the experimental pastes compared to the triple antibiotic paste. These results may be influenced by the agar diffusion test when applied to natural extracts. The limitations are as follows: limited and irregular diffusion rates of bioactive compounds. Due to the complex composition of the natural extract, some compounds may experience limited penetration, resulting in irregular zones of inhibition; interference with the composition of the agar, affecting the diffusion process and the lack of standardization of the agar medium (37). The results confirm the antibacterial activity of propolis against E. faecalis, and it could serve as an alternative intracanal paste for pulpectomy treatments. Despite using bacteria in a different way than that found in pulp pathologies, future studies could take a more clinically oriented approach, avoiding the use of an agar model and opting for a model that better reproduces oral conditions.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

V. CONCLUSION

Propolis displayed a significant concentration of phenolic compounds and total flavonoids, emphasizing its potential as a rich source of bioactive compounds. Moreover, the PAE exhibited antimicrobial activity against *E. faecalis*. However, the antibacterial efficacy demonstrated by the PAE paste was found to be reduced compared to the triple antibiotic paste, likely influenced by the experimental design employed. The results suggest that PAE could serve as a viable alternative to conventional intracanal pastes. Nevertheless, further studies are necessary to validate and optimize its use in pulpectomy treatments.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

VI. TABLES AND FIGURES

Table 1. Solubility test of propolis extract in various solvents.

Solvents	Solubility index*
Distilled water	+
Ethanol 70º	+
Ethanol 96º	+++
Acetonitrile	+
Dichlorometane	+++
Chloroform	++
Methanol	+++
Sodium hydroxide 10%	-
Hydrocloridic acid 10%	-

* (-) No dissolution was observed; (+) A small amount of propolis was dissolved. Particle agglomeration was seen at the bottom of the tube; (++) Some particles were dissolved in the solvent, but the precipitate indicates partial or total fragmentation; (+++) Most particles were dissolved in the solvent.

Table 2 Phytochemical screening of the propolis extract.

Chemical class	Method	Result*
Amino acids	Ninhidrina	-
Proteins	Biuret	-
Carbohydrates	Molish	-
Reducing sugars	Feeling	-
Cardiotonic glycosides	Kedde	+
Resins	Distilled water	+
Lipids	Sudan	+
Tannins	Gelatin test	+
Alkaloids	Dragendorff	+
Alkaloids	Mayer	+
Flavonoids	Shinoda	+
Anthocyanidins	Amyl acid	+
Aldehydes and ketones	Tollens	+
Saponinas	Foam test	-
Triterpenoids and steroids	Lieberman-Buchard	+
Quinones	Bontrager	-
Catechins	Sodium carbonate	+

* +: presence, -: absence.

Table 3. Diameter of inhibition zone in millimeters of the experimental intracanal pastes against *E. faecalis* (n=15).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Group	Median (IQR)
Control (Propylene glycol)	0 (0) C
Propolis 130 mg/ml	8.1 (3.1) B
Propolis 200 mg/ml	8.5 (2.9) B
Triple antibiotic paste	36.0 (9.5) A

*Medians followed by different letters indicate statistical differences. Kruskal-Wallis test (α=0.05).

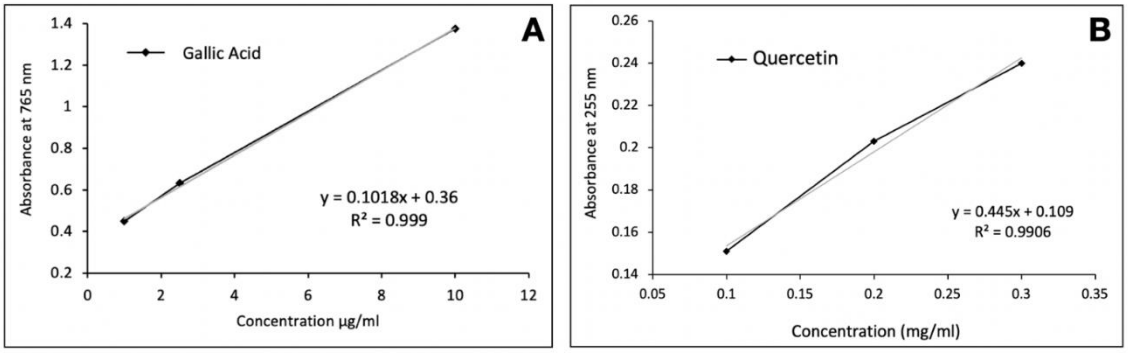


Fig. 1 Calibration curves. (A) Calibration curve of gallic acid for determining the total content of phenolic compounds, and (B) Calibration curve of quercetin for determining the total flavonoid content.

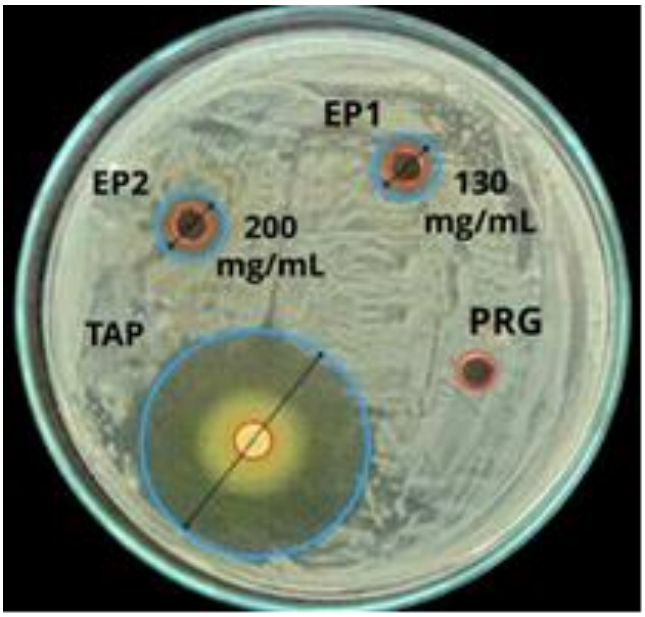


Fig.2 The Petri dish displays the antimicrobial activity of the intracanal pastes against *E. faecalis*. PRG: Propylene Glycol, TAP: Triple antibiotic paste, PE1: PAE paste at 130 mg/ml, and PE2: PAE paste at 200 mg/ml.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

VERSIÓN EN ESPAÑOL

I. INTRODUCCIÓN

Los problemas pulpares pediátricos son un desafío común en la odontología pediátrica que presenta consideraciones distintas a los pacientes adultos (1). La terapia pulpar a menudo aborda problemas como la reabsorción radicular, el soporte óseo inadecuado, las complicaciones periodontales, la presencia de gérmenes dentales permanentes y los desafíos relacionados con la cooperación del paciente (2,3). Dado que la dentición primaria es crucial en el desarrollo de la oclusión, el enfoque de la terapia pulpar se orienta a preservar los dientes para garantizar una secuencia de erupción óptima (4).

La técnica de esterilización de lesiones y reparación de tejidos (LSRT) es un método utilizado para el tratamiento pulpar en dientes primarios. Este enfoque se distingue por requerir poca o ninguna instrumentación y por la aplicación de una mezcla de antibióticos en un vehículo como el propilenglicol en el sistema de conductos radiculares (4,5). La esterilización se logra al reducir significativamente la carga microbiana, promover la reparación de los tejidos y prevenir la pérdida prematura dental, creando así un entorno favorable para la curación natural de los tejidos. En los últimos años, LSTR ha llamado la atención por su potencial para facilitar la remineralización de la dentina y apoyar el proceso de curación natural en pacientes pediátricos (5,6). El medicamento más común utilizado en LSTR es la pasta triple antibiótica, que combina metronidazol, ciprofloxacino y minociclina (7,8).

La combinación de antibióticos de la pasta triple antibiótica garantiza un amplio espectro de acción para la esterilización del sistema de conductos radiculares en dientes

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

primarios (9). El metronidazol exhibe actividad antibacteriana contra las bacterias anaeróbicas, la minociclina actúa como un agente bacteriostático con actividad contra las bacterias grampositivas y gramnegativas, mientras que la ciprofloxacina demuestra una alta actividad, particularmente contra las bacterias gramnegativas (9-11). En los últimos años, ha crecido el interés en el uso de productos naturales en el campo biomédico por sus propiedades antimicrobianas, con el propóleo particularmente.

El propóleo es un compuesto natural pegajoso obtenida a través de las abejas mediante resina de flores y hojas de árboles y plantas mezcladas con su saliva (12,13). El propóleo es un producto natural complejo que comprende 30% de cera, 50% de resina y bálsamo vegetal, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y otras sustancias impregnadas del aroma de álamo, miel y vainilla (14). Varios estudios han relacionado la actividad antimicrobiana del propóleo con los flavonoides y fenoles presentes en su composición (13,15,16). Múltiples investigaciones han demostrado la eficacia del propóleo al exhibir actividad antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, una bacteria que a menudo resulta desafiante en el contexto de las infecciones por pulpa (17,18). Sin embargo, falta de información sobre el uso del propóleo como pasta en la técnica LSTR.

Por lo tanto, el propósito de este estudio fue obtener un extracto alcohólico de propóleo, analizar su perfil fitoquímico y probar su actividad antibacteriana contra *E. faecalis* para demostrar su uso potencial en tratamientos pulpares para dientes primarios. Las hipótesis fueron que: (i) el extracto alcohólico de propóleo tendría compuestos fenólicos y contenido de flavonoides, (ii) el extracto alcohólico de propóleo tendría actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*, y (iii) no habría diferencias entre el extracto alcohólico de

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

propóleo y la pasta triple antibiótica como medicamento intracanal con respecto a su actividad antibacteriana contra *E. faecalis*.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra de propóleo y preparación de extracto alcohólico

El propóleo obtenido de la ciudad de Tarapoto en la Amazonía peruana fue donado por el Centro Nacional de Investigación Social e Interculturalidad en Salud del Instituto Nacional de Salud de Perú y almacenado a 4 °C. El extracto alcohólico de propóleo se elaboró en el Laboratorio de Química y Bioquímica de Productos Naturales de la Universidad Científica del Sur (Lima-Perú). Doscientos gramos de propóleo fueron molidos manualmente y colocados en un matraz con etanol al 96% para obtener una solución de 10% w/v. La solución se sometió a agitación orbital a 200 rpm por 3 h a 25 °C (Orbit 1000, Labnet International, EE. UU.) y se protegió de la luz. El macerado obtenido pasó un proceso duplicado con papel filtro y almacenaje por 7 días a temperatura ambiente en condiciones oscuras para luego retirar el sobrenadante con una pipeta, pasar por papel filtro y eliminar el etanol en un evaporador rotatorio a 20 rpm y 100 bar por 4 h a 40 °C (RV 10C, IKA-Werke GmbH, Alemania). El extracto se recogió y almacenó en un recipiente de vidrio a 40 °C por 24 h para garantizar la eliminación del disolvente hasta obtener una resina de alta viscosidad almacenada a 4 °C.

Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento

Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), obtenido del Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular de la Universidad

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Científica del Sur en Lima, Perú. El cultivo bacteriano fue obtenido, el cual estuvo previamente almacenado a –80 °C en un medio de infusión cerebro corazón (BHI) con un 20% de glicerol (19). Para la reactivación, 50 µL de la solución con glicerol se sembró por estriado en una placa de Petri con agar BHI y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. La pureza del cultivo se confirmó utilizando el método de tinción de Gram.

Ensayo de solubilidad del extracto de propóleo

Una prueba de solubilidad fue realizada para identificar el disolvente óptimo para el extracto de propóleo. Una cantidad de 1 mg del extracto alcohólico fue diluida en 1 ml de nueve soluciones diferentes: agua, 70% de alcohol, 96% de alcohol, acetonitrilo, diclorometano, cloroformo, metanol, 10% de hidróxido de sodio y 10% de ácido clorhídrico. Posteriormente, cada tubo en un agitador vortex a 4200 rpm fue colocado durante 60 segundos.

Perfil fitoquímico

Prueba de proteínas: a) *Prueba de ninhidrina*. Una cantidad de 1 ml del extracto alcohólico de propóleo (PAE) fue agitado con 2 ml de reactivo de ninhidrina. Luego, la mezcla fue hervida durante unos minutos. La formación de un color azul implica la presencia de proteínas. b) *Prueba de Biuret*. Una cantidad de 1 ml de PAE con 1 ml reactivo de biuret fueron mezclados. El desarrollo de un color violeta indica la presencia de un enlace peptídico.

Prueba de glucósidos: a) *Prueba de Molisch*. Una cantidad de 2 ml de PAE, 1 ml de reactivo de Molisch y unas gotas de ácido sulfúrico en un tubo de ensayo fueron combinados y mezclados. La formación de un anillo púrpura o rojo púrpura confirma la

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

presencia de carbohidratos. b) *Prueba de Feling.* Una cantidad de 1 ml del reactivo A de Feling y 1 ml del reactivo B de Feling fueron añadidos y agitados en un tubo de ensayo, luego en un baño maría fueron sometidos. Después de 1 minuto, 1 ml de PAE fue añadido y mantenido en baño maría durante 10 minutos. La aparición de un precipitado de color marrón rojizo confirma la presencia de azúcares reductores. c) *Prueba de Kedde*. El reactivo A de Kedde (1 ml), el reactivo B de Kedde (1 ml) y el PAE (1 ml) fueron mezclados en un tubo de ensayo y agitados durante 30 segundos. La formación de un color azul-violeta en las siguientes 2 horas confirma la presencia de glicósidos cardiotónicos.

Prueba de resinas. Una cantidad de 1 ml de PAE y 5 ml de agua destilada fueron mezclados en un tubo de ensayo. La presencia de resinas se implica debido a la formación de precipitado en la parte inferior. a) Prueba de lípidos. *Prueba de Sudán*. Una cantidad **de** 1 ml de PAE y 1 ml de tinte Sudan III fueron combinados en un tubo de ensayo. La mezcla fue mantenida en baño maría hasta que el disolvente se evapore. La detección de un tono rojizo confirma la existencia de lípidos. b) *Prueba de Liebermann-Buchart*. Una cantidad de 1ml de PAE fue colocado en un tubo de ensayo y fue mantenido en baño maría hasta que el disolvente se evapore. El extracto fue disuelto en cloroformo, Unas gotas de ácido sulfúrico fueron añadidos y mezclados con cuidado. La formación de un color verde o verde-azul confirma la presencia de triterpenos y esteroides. c) Prueba de fenoles. *Prueba de gelatina*. Una cantidad de 1 ml de PAE fue combinado con 1 ml de solución de gelatina y se agitó. La formación de un precipitado blanco indica la presencia de fenoles.

Prueba de alcaloides. a) *Prueba de Dragendorff*. Una cantidad de 1 ml de PAE fue

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

calentado en baño maría para evaporar el disolvente. El extracto en 1 ml de ácido clorhídrico al 1% fue disuelto y seis gotas de reactivo de Dragendorff fueron añadidos. La aparición de un precipitado naranja-rojizo indica la presencia de alcaloides. b) *Prueba de Mayer*. Una cantidad de 1 ml de PAE fue calentado en baño maría para evaporar el disolvente. El extracto en 1 ml de ácido clorhídrico fue disuelto al 1% y fueron añadidos seis gotas del reactivo de Mayer. La aparición de un precipitado blanco o crema indica la presencia de alcaloides.

Prueba de flavonoides. *Prueba de Shinoda*. Una cantidad de 1 ml de PAE con 1 ml de ácido clorhídrico en un tubo de ensayo fueron mezclados. Una pequeña cinta de magnesio a la solución fue añadida, seguida de 1 ml de alcohol amílico. La formación de coloración rosa indica la presencia de flavonoides.

Prueba de antocianina. *Prueba de amílico.* Una cantidad de 1 ml de PAE con 0,5 ml de ácido clorhídrico en un tubo de ensayo fueron mezclados y mantenidos en un baño maría durante diez minutos. Después de enfriar, 0,5 ml de agua destilada y 1 ml de alcohol amílico fueron añadidos y agitados. La presencia de antocianina indica la formación de coloración roja o marrón.

Prueba de aldehído y cetonas. *Prueba de Tollens*. Una cantidad de 1 ml de PAE fue mezclado con 1 ml de reactivo de Tollens en un tubo de ensayo y fue calentado en baño maría. Los aldehídos se observan mediante la formación de un precipitado de espejo plateado.

Prueba de saponinas. *Prueba de espuma*. Una cantidad de 1 ml de PAE fue calentado a baño maría hasta la evaporación del disolvente. Luego, el extracto fue agitado

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

vigorosamente con 2 ml de agua durante tres minutos y para detectar la formación de espuma fue inspeccionado. Si la espuma producida persiste durante 10 minutos, indica la presencia de saponinas.

Prueba de quinonas. *Reacción de Bornträger*. Una cantidad de 1 ml de PAE en un tubo de ensayo fue calentado en baño María para evaporar el disolvente. Después, el extracto en cloroformo fue disuelto y 1 ml de reactivo de Bornträger fue añadido. La presencia de quinonas se indica por la formación de una coloración roja

Prueba de catequina. Dos gotas de PAE fueron aplicados al papel filtro junto con unas gotas de solución de carbonato de sodio. El papel se expuso a la luz UV. La presencia de una mancha verde bajo la luz UV confirma la presencia de catequina.

Análisis de contenido total de fenólicos

El método de reactivo de Folin-Ciocalteu fue realizado para determinar el contenido fenólico del extracto alcohólico de propóleos. Las muestras de propóleos con 0,2 ml de PAE (26,1 mg/ml), 1 ml de reactivo Folin-Ciocalteau, 0,5 ml de carbonato de sodio anhidro y 0,9 ml de agua destilada fueron preparados, lo que resultó en un volumen final de 2,6 ml. La mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones oscuras fue incubada. Después de la incubación, el contenido fenólico total a 765 nm contra la solución en blanco, utilizando un espectrómetro UV/Vis (Genesys 10 UV, Thermo Scientific, Rochester, NY, EE. UU.) fue medido. Además, Un procedimiento similar utilizando alícuotas de 10, 25, 50 y 100 µl de una solución de ácido gálico (10 mg) fue replicado para construir la curva de calibración estándar del ácido gálico. En última instancia, se evaluó el contenido total de compuestos fenólicos con la curva de

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

calibración estándar de ácido gálico fue evaluado y expresado en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de PAE (mg EAG/g de PAE), determinado de acuerdo con la ecuación de regresión: y = 0.0098x - 0.0035 con R^2 = 0.999. Tres experimentos independientes fueron realizados.

Análisis del contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides del PAE se determinó utilizando quercetina como estándar de referencia. Las muestras de propóleo se prepararon con PAE (26,1 mg/ml) diluido en etanol al 96% para alcanzar una concentración de 0,605 mg/ml. El contenido total de flavonoides se midió a 725 nm contra la solución en blanco, utilizando un espectrómetro UV/Vis. Un procedimiento similar para obtener tres estándares de quercetina con concentraciones finales de 0,3, 0,2 y 0,1 mg/ml utilizando un 96% de etanol como disolvente fue repetido para construir la curva de calibración estándar de quercetina. Finalmente, el contenido total de compuestos flavonoides se evaluó frente a la curva de calibración estándar de quercetina y se expresó en mg de equivalente de quercetina por gramo de PAE (mg EQ/g de PAE), obtenido de acuerdo con la ecuación de regresión: y= 0,0445x + 0,109 con R2= 0,9906. Tres experimentos independientes fueron realizados.

Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (CMB)

Una cantidad de 1 g de PAE fue diluido en 2 ml de etanol al 70% a través de centrifugación a baja velocidad (430 rpm) durante 3 minutos. Posteriormente, la solución se filtró través de un filtro de 0,22 µm, se almacenó en una botella de vidrio ámbar a 4 ºC hasta su uso. La actividad antimicrobiana de PAE contra *E. faecalis* se evaluó para determinar su concentración mínima inhibitoria (MIC) y su concentración

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

mínima bactericida (CMB). Los cultivos de *E. faecalis* se cultivaron en medio BHI durante 14 h a 37 °C. Posteriormente, las células microbianas se resuspendieron en una solución salina y se ajustaron a 0,5 en la escala de McFarland. Para determinar la MIC, el PAE se diluyó en serie de 150 a 40 mg/ml en medio BHI en una placa de 96 pozos (100 µl). Luego, 100 µl del inóculo ajustado a cada pozo fue añadido, y se incubaron todas las placas (24 h, 37 °C). Después de la incubación, la fila de pozos con la dilución más baja que no mostraba turbidez fue identificado y se definió como la MIC. Para confirmar los resultados del método visual, 50 µl de resazurina (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) (0,1%) fueron añadidos a cada pozo. Después de una mayor incubación de 30 minutos a 37 °C en condiciones oscuras, las placas se inspeccionaron visualmente de nuevo. El cambio de color de púrpura a rosa se consideró un crecimiento bacteriano positivo. Para determinar la CMB, 10 µl de cada pozo por triplicado en placas de agar BHI fue sembrado, las cuales se incubaron a 37 °C durante 24 horas para observar el crecimiento bacteriano. Se realizaron tres experimentos independientes MIC y CMB.

Ensayo de difusión en agar con pozos

Para evaluar la actividad antimicrobiana de la PAE, una prueba de sensibilidad a la difusión fue realizada utilizando el ensayo de difusión en agar. Dos pastas intracanal experimentales fueron preparados basadas en PAE con propilenglicol como vehículo. La concentración de las pastas experimentales se determinó utilizando los resultados de los ensayos MIC y CMB. Una pasta se formuló utilizando la concentración del CMB, mientras que la otra se preparó a una concentración aproximadamente un 50% más alta que la de CMB. Estas pastas se compararon con una pasta triple antibiótica (control positivo) y propilenglicol (control negativo). Un cultivo bacteriano de *E. faecalis* fue

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

preparado como se describió anteriormente. Se extendió una alícuota del cultivo bacteriano (50 µl) sobre la superficie de una placa de Petri (n=5) que contenía agar BHI utilizando una espátula Drigalski esterilizada. Cuatro pozos (4 mm de profundidad y 5 mm de diámetro) en el agar fueron cortados para cada pasta después de 5 minutos. Luego, 50 µl de cada pasta fue agregado a los pozos utilizando una espátula estéril. Finalmente, las placas fueron incubados a 37 °C durante 24 horas.

La preparación de las pastas experimentales fue la siguiente: Pasta triple antibiótica: Ciprofloxacina (Clorfex 500 mg, INRETAIL PHARMA S.A, Madrid, España), minociclina (Acnebiot 100 mg, INRETAIL PHARMA S.A., Madrid, España), y metronidazol (Flagimed 500 mg, INRETAIL PHARMA S.A, Madrid, España); vehículo: propilenglicol (Farmacia Universal, Lima, Perú) y los antibióticos se mezclaron en una proporción de 1:1:1, siguiendo el método propuesto por Hoshino et al. (7) Micropipetas (ISOLAB, Laborgerate GmbH, Eschau, Alemania) fueron empleados para la medición del PAE y el propilenglicol, y una balanza analítica (Pioneer Analytical PX224, Ohaus, Parsippany, NJ, EE. UU.) para el pesaje de los antibióticos. Todas las pastas experimentales se prepararon recientemente antes de su utilización. Después de la incubación, la actividad antibacteriana fue determinada midiendo la zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los pozos en milímetros, calculada como la distancia más corta entre el margen del pozo y el crecimiento bacteriano inicial. Cada placa de Petri fue fotografiada individualmente con una cámara de celular y las imágenes fueron transferidas al software de acceso abierto ImageJ (US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Se calibró trazando una línea sobre un objeto de referencia, el cual era una regla colocada en la imagen. Luego, se trazó una línea que cubriera el

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

ancho del halo de inhibición y posteriormente se analizó su medida en milímetros. (20) El método de difusión en pozos de agar se llevó a cabo tres veces.

Análisis estadístico

Los datos del ensayo de difusión en agar con pozos fueron aprobados para la normalidad y homogeneidad de las variaciones utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett (α=0.05). Los resultados no seguían una distribución normal ($p<0.05$). Luego, una prueba de Kruskall-Wallis (α=0,05) fue empleada para analizar las diferencias estadísticas entre los grupos. El análisis de datos fue realizado utilizando STATA 17.0 (Stata Corporation, Texas, EE. UU.).

III. RESULTADOS

Los resultados de la prueba de solubilidad del propóleo en agua y varios disolventes orgánicos se presentaron en la **Tabla 1.** El propóleo exhibió la mayor solubilidad en 96º de etanol, diclorometano y metanol. Por el contrario, no se observaron solubilidad en el hidróxido de sodio (10%) y el ácido clorhídrico (10%).

Las pruebas identificaron 16 compuestos químicos en el perfil fitoquímico del extracto de propóleo. Las reacciones con varios reactivos revelaron la presencia o ausencia de los compuestos investigados, tal como se presenta en la **Tabla 2.** La detección fitoquímica identificó la presencia de lípidos, taninos y compuestos fenólicos, incluyendo flavonoides, entre otros compuestos. Por el contrario, no se detectaron aminoácidos, saponinas y quinonas, entre otros. El contenido de compuestos fenólicos fue de 49,8 ± 0,13 EAG mg/ml de PAE y de 1,0338 ± 0,03 EQ mg/ml de PAE para los flavonoides.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Los resultados de las propiedades antimicrobianas del extracto de propóleo contra *E. faecalis* determinaron que la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) fue de 60 mg/ml y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue de 130 mg/ml. El ensayo de difusión del pozo de agar reveló un potente efecto bacteriano de la pasta triple antibiótica, con diferencias estadísticamente significativas en comparación con ambas pastas a base de propóleo de 200 mg/ml y 130 mg/ml. No se observaron diferencias estadísticas entre las formulaciones de pasta que contenían propóleo **(Tabla 3).**

IV. DISCUSIÓN

Las abejas producen propóleo, una sustancia resinosa que resulta de la mezcla de saliva, cera de abejas y brotes de plantas (12,13). Este compuesto presenta diversas propiedades, como efectos antituberculosos (21), antiinflamatorios (12,22), antivirales (12,23) y antioxidantes (12,24,25), así como propiedades inmunomoduladoras, respaldadas por varios estudios que demostraron su actividad antibacteriana (13,26–29).

El disolvente empleado en la preparación del PAE podría afectar sus propiedades biomédicas (16,25). En este estudio, se eligió al etanol como disolvente para extraer compuestos del propóleo debido a su eficacia conocida en la disolución de compuestos fenólicos y flavonoides, el cual es considerado estándar de oro (29-32). El extracto de propóleo se disolvió eficazmente en 96% de etanol, diclorometano y metanol, según la prueba de solubilidad realizada. El etanol fue elegido por su capacidad de evaporación sin afectar los compuestos extraídos y potencial para mejorar la actividad antibacteriana del propóleo debido a su seguridad y costo (31,32). Las preocupaciones sobre el uso de

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

etanol, en mujeres embarazadas, lactantes, niños y entre otros, han impulsado a buscar disolventes alternativos (29,33).

Las propiedades del propóleo varían según la raza de las abejas, la región, la fuente botánica (34,35) y la temporada de recolección (13,36), variando sus compuestos bioactivos. Un estudio halló correlación entre la actividad antioxidante, el origen y los compuestos fenólicos del propóleo al comparar muestras de distintas regiones y fuentes vegetales (35). En otro estudio, se evaluaron las propiedades antibacterianas, citotóxicas y composiciones químicas de 13 muestras de propóleo peruano contra biopelículas orales, encontrando variaciones en su actividad antibacteriana y en los compuestos bioactivos (34).

En este estudio, se realizó un tamizaje fitoquímico del PAE, revelando la presencia de alcaloides, resinas, aldehídos, cetonas, triterpenos, esteroides, fenoles y flavonoides, los cuales, junto con otros compuestos, contribuyen a las propiedades bioactivas del propóleo (24). La falta de métodos y análisis estandarizados para evaluar su composición dificulta la comprensión de sus propiedades bioactivas y los compuestos relacionados (37). Los hallazgos respaldaron la hipótesis inicial de que había compuestos fenólicos y flavonoides en el PAE. Estos compuestos tienen propiedades terapéuticas y una fuerte actividad antibacteriana, lo que podría ser indicativo de la calidad del propóleo. (25,35,38). Además, los flavonoides, como subclase de compuestos fenólicos, exhiben actividad antibacteriana al alterar las membranas celulares bacterianas e inhibir el crecimiento microbiano (18).

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

El propóleo ejerce su efecto antibacteriano mediante diversos mecanismos de acción: impide la síntesis de ácidos nucleicos, modifica la función de la membrana citoplasmática, suprime el metabolismo energético, reduce la capacidad de las bacterias para formar biopelículas, inhibe las proteínas de la membrana celular y altera la permeabilidad de la membrana (39). El mecanismo de acción varía según la composición, estructura y la bacteria (40). Por ende, no hay un mecanismo único establecido (41). Su acción colectiva ofrece una alternativa natural a los antibióticos convencionales (29), destacando la importancia de cuantificarlos en el extracto de propóleo para evaluar su actividad antibacteriana.

En este estudio, se notaron variaciones en los compuestos fenólicos y flavonoides del PAE (Fig. 1), como se esperaba debido a las diferencias en el perfil fitoquímico relacionadas con la temporada, lugar de recolección y métodos de extracción (26). Hernández y cols. encontraron una amplia variabilidad en los compuestos fenólicos (de 68 a 500 EQ mg/g) y flavonoides (equivalentes de ácido cafeico de 13 a 379 mg/g) en el PAE (38). Otro estudio sobre propóleo de Polonia mostró una alta variabilidad en el contenido de fenoles (de 116,16 a 219,41 EAG mg/g) y flavonoides (de 29,63 a 106,07 EQ mg/g) (42). Según Paula y cols., el método de análisis del propóleo también afecta la variabilidad en los compuestos encontrados en la literatura (43). Por lo tanto, no hay un nivel mínimo universalmente aceptado para estos compuestos en el propóleo.

Estudios previos revelaron valores de MIC entre 2 µg/ml y 1000 µg/ml (27,28), en esta investigación el resultado del MIC (60 mg/ml) exhibe actividad antibacteriana contra *E. Faecalis,* se encuentra en el rango intermedio. Los valores de MIC se pueden atribuir a la metodología, diseño experimental y origen del propóleo.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

El propilenglicol se emplea como vehículo en endodoncia. Es incoloro, con un suave olor acre y sabor dulce. Además de demostrar eficacia germicida, posee potencial para prevenir y tratar infecciones microbianas. En comparación con otros vehículos, presenta baja citotoxicidad. Sus propiedades antibacterianas permiten una liberación sostenida del medicamento, y su baja tensión superficial le confiere la ventaja de ser penetrable a través de los túbulos dentinarios (44).

La prueba de difusión en agar mostró una actividad antibacteriana reducida para las pastas experimentales en comparación con la pasta triple antibiótica. Estos resultados pueden estar influenciados por la prueba de difusión en agar cuando se aplica a extractos naturales.

Las limitaciones son las siguientes: tasas de difusión limitadas e irregulares de compuestos bioactivos. Debido a la compleja composición del extracto natural, algunos compuestos pueden experimentar una penetración limitada, lo que resulta en zonas irregulares de inhibición; interferencia con la composición del agar, afectando el proceso de difusión y la falta de estandarización del medio agar (37).

Los resultados confirman la actividad antibacteriana del propóleo contra *E. faecalis*, y podría servir como pasta intracanal alternativa para tratamientos de pulpectomía. A pesar de utilizar bacterias en una forma diferente a la que se encuentra en las patologías pulpares, estudios futuros podrían adoptar un enfoque más orientado clínicamente, evitando el uso de un modelo de agar y optando por un modelo que reproduzca mejor las condiciones orales.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

V. CONCLUSIÓN

El propóleo mostró una concentración significativa de fenoles y flavonoides, destacando su capacidad como una rica fuente de compuestos bioactivos. Además, el Extracto Alcohólico de Propóleo exhibió actividad antimicrobiana contra *E. faecalis*. Sin embargo, se encontró que la eficacia antibacteriana demostrada por la pasta PAE era reducida en comparación con la pasta triple antibiótica, posiblemente influenciada por el diseño experimental empleado. Los resultados sugieren que el PAE podría ser considerado como una alternativa viable a las pastas intracanal convencionales. No obstante, se necesitan más estudios para validar y optimizar su uso en tratamientos de pulpectomía.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

VII. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Prueba de solubilidad del extracto de propóleo en diversos solventes.

Solventes	Índice de solubilidad*
Agua Destilada	+
Etanol 70º	+
Etanol 96º	+++
Acetonitrilo	+
Diclorometano	+++
Cloroformo	++
Metanol	+++
HIdróxido de sodio 10%	-
Ácido clorhídrico 10%	-

*(-) No se observó disolución; (+) Se disolvió una pequeña cantidad de propóleo. Se observó aglomeración de partículas en el fondo del tubo; (++) Algunas partículas se disolvieron en el disolvente, pero el precipitado indica fragmentación parcial o total; (+++) La mayoría de las partículas se disolvieron en el disolvente.

Tabla 2. Perfil fitoquímico del extracto de propóleo.

Clase Química	Método	Resultado
Aminoácidos	Ninhidrina	-
Proteínas	Biuret	-
Carbohidratos	Molish	-
Azúares reductores	Feeling	-
Glucósidos cardiotónicos	Kedde	+
Resinas	Agua destilada	+
Lípidos	Sudan	+
Taninos	Prueba de gelatina	+
Alcaloides	Dragendorff	+
Alcaloides	Mayer	+
Flavonoides	Shinoda	+
Antocianidinas	Ácido amílico	+
Aldehídos y cetonas	Tollens	+
Saponinas	Prueba de espuma	-
Triterpenoides y esteroides	Lieberman-Buchard	+
Quinonas	Bontrager	-
Catequinas	Carbonato de Sodio	+

* +: presencia, -: ausencia.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Tabla 3. Diámetro de la zona de inhibición en milímetros de las pastas intracanal experimentales contra E. *faecalis* (n=15).

Grupo	Mediana (RIQ)
Control (Propilenglicol)	0 (0) C
Propóleo 130 mg/ml	8.1 (3.1) B
Propóleo 200 mg/ml	8.5 (2.9) B
Pasta triple antibiótica	36.0 (9.5) A

* Las medianas seguidas de letras diferentes indican diferencias estadísticas. Prueba de Kruskal-Wallis (α=0.05).

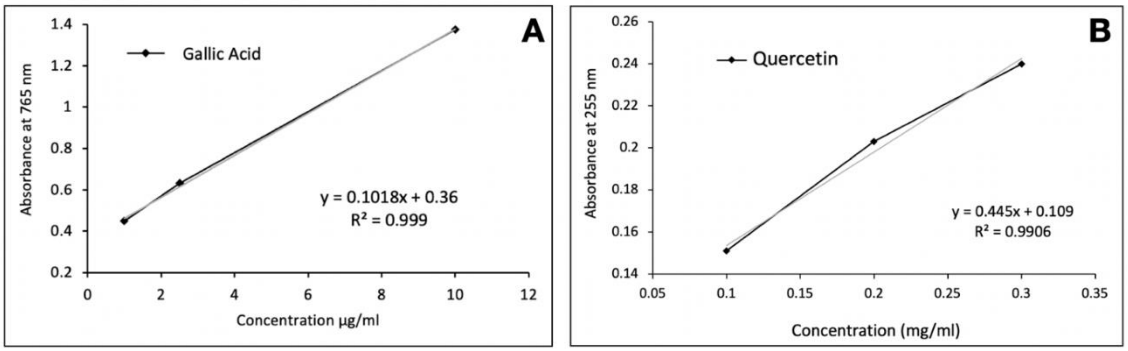


Figura 1. Curva de calibración del ácido gálico para la determinación del contenido fenólico total (A) y Curva de calibración de quercetina para determinar el contenido total de flavonoides (B).

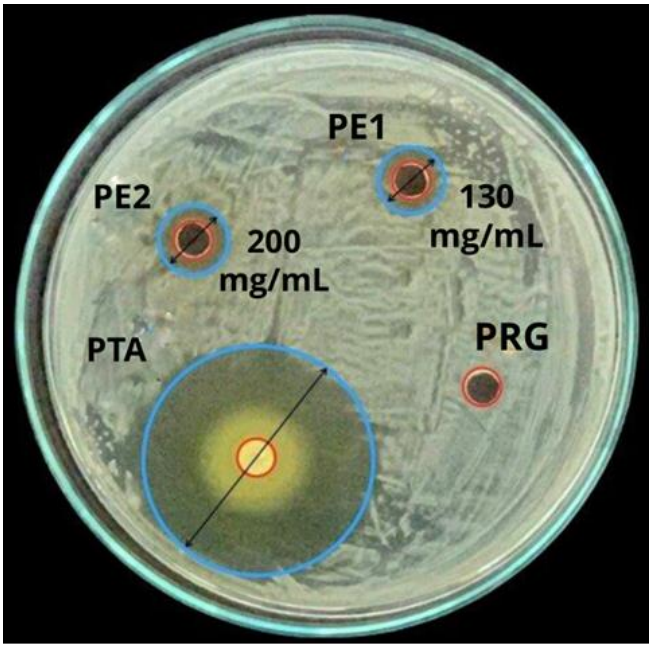


Figura 2. La placa de Petri muestra la actividad antimicrobiana de las pastas intracanal contra *E. faecalis*. PRG: Propilenglicol, PTA: Pasta triple antibiótica, PE1: Pasta PAE a 130 mg/ml y PE2: Pasta PAE a 200 mg/ml.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Igna A, Mircioagă D, Boariu M, Stratul Ștefan I. A Diagnostic Insight of Dental Pulp Testing Methods in Pediatric Dentistry. Medicina (Lithuania). 2022;58(5).
2. Sain S, J R, S A, George S, Issac JS, John SA. Lesion Sterilization and Tissue Repair–Current Concepts and Practices. Int J Clin Pediatr Dent. 2018;11(5):446–50.
3. Duarte ML, Pires PM, Ferreira DM, Pintor AVB, de Almeida Neves A, Maia LC, et al. Is there evidence for the use of lesion sterilization and tissue repair therapy in the endodontic treatment of primary teeth? A systematic review and meta-analyses. Clin Oral Investig. 2020;24(9):2959–72.
4. Revision L. Management of the Developing Dentition and Occlusion in Pediatric Dentistry. Pediatr Dent. 2018 Oct 15;40(6):352–65.
5. Achanta A, Reche A, Dakhale R, Bharate RR. A Comprehensive Review of Lesion Sterilization and Tissue Repair: An Alternative for Pulpectomy in Deciduous Teeth. Cureus. 2023 Nov 3;15(11).
6. Burrus D, Barbeau L, Hodgson B. Treatment of abscessed primary molars utilizing lesion sterilization and tissue repair: literature review and report of three cases. Pediatr Dent. 2014;36(3):240–4.
7. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. Int Endod J. 1996;29(2):125–30.
8. Sato I, Ando-Kurlihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. Int Endod J. 1996;29(2):118–24.
9. Malu K, Khubchandani M. Triple Antibiotic Paste: A Suitable Medicament for Intracanal Disinfection. Cureus. 2022;14(4):2–5.
10. Sijini OT, Sabbagh HJ, Baghlaf KK, Bagher AM, El-housseiny AA, Alamoudi NM, et al. Clinical and radiographic evaluation of triple antibiotic paste pulp therapy compared to Vitapex pulpectomy in non-vital primary molars. Clin Exp Dent Res. 2021;7(5):819–28.
11. Gupta S, Kundabala M, Acharya S, Ballal V. A comparative evaluation of the antibacterial efficacy of propolis, 3.0% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate against Enterococcus Faecalis - An in vitro study. Endodontology. 2007;19(2):31.
12. 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. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2015;2015.
13. Hossain R, Quispe C, Khan RA, Saikat ASM, Ray P, Ongalbek D, et al. Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. Chinese Medicine (United Kingdom). 2022;17(1):3-22.
14. Zabaiou N, Fouache A, Trousson A, Baron S, Zellagui A, Lahouel M, et al. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. Chem Phys Lipids . 2017; 207:214–22.
15. Kara Y, Can Z, Kolaylı S. What Should Be the Ideal Solvent Percentage and Solvent-Propolis ratio in the Preparation of Ethanolic Propolis Extract? Food Anal Methods. 2022;15(6):1707–19.
16. de Mendonça ICG, Porto ICC de M, do Nascimento TG, de Souza NS, Oliveira JM dos S, Arruda RE dos S, et al. Brazilian red propolis: Phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. BMC Complement Altern Med. 2015;15(1):1–12.
17. Love RM. Enterococcus Faecalis a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001;34(5):399–405.
18. Madhubala MM, Srinivasan N, Ahamed S. Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against enterococcus faecalis. J Endod. 2011;37(9):1287–9.
19. Ocares Y, Castro JF. Preservación de microorganismos por congelación. Boletín INIA. 2020; 428: 119-134.
20. Schroeder AB, Dobson ETA, Rueden CT, Tomancak P, Jug F, Eliceiri KW. The ImageJ ecosystem: Open-source software for imagen visualization, processing, and analysis. Protein Science. 2021; 30(1): 234-49.
21. Maiolini M, Gause S, Taylor J, Steakin T, Shipp G, Lamichhane P, et al. The War against Tuberculosis: A Review of Natural Compounds and Their Derivatives. Molecules. 2020;25(13):3011.
22. Kurek-Górecka A, Kłósek M, Pietsz G, Czuba ZP, Kolayli S, Can Z, et al. The Phenolic Profile and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Polish Propolis on Activated Human Gingival Fibroblasts-1 Cell Line. Molecules. 2023 ;28(22):7477.
23. Vilhelmova-Ilieva NM, Nikolova IN, Nikolova NY, Petrova ZD, Trepechova MS, Holechek DI, et al. Antiviral Potential of Specially Selected Bulgarian Propolis Extracts: In Vitro Activity against Structurally Different Viruses. Life. 2023;13(7):1611.
24. Kurek-Górecka A, Keskin Ş, Bobis O, Felitti R, Górecki M, Otręba M, et al. Comparison of the Antioxidant Activity of Propolis Samples from Different Geographical Regions. Plants. 2022;11(9):1–17.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

25. Woźniak M, Mrówczyńska L, Kwaśniewska-Sip P, Waśkiewicz A, Nowak P, Ratajczak I. Effect of the Solvent on Propolis Phenolic Profile and its Antifungal, Antioxidant, and In Vitro Cytoprotective Activity in Human Erythrocytes Under Oxidative Stress. Molecules. 2020;25(18):4266.
26. Torres AR, Sandjo LP, Friedemann MT, Tomazzoli MM, Maraschin M, Mello CF, et al. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from melipona quadrifasciata quadrifasciata and tetragonisca angustula stingless bees. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2018;51(6):1–10.
27. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Sali¨h B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiol Res .2005 ;160(2):189–95.
28. Pimenta HC, VIolante IMP, Musis CR de, Borges ÁH, Aranha AMF. In vitro effectiveness of Brazilian brown propolis against Enterococcus faecalis. Braz Oral Res. 2015;29(1):1–6.
29. Šuran J, Cepanec I, Mašek T, Starčević K, Gajger IT, Vranješ M, et al. Nonaqueous polyethylene glycol as a safer alternative to ethanolic propolis extracts with comparable antioxidant and antimicrobial activity. Antioxidants. 2021:10(6):4-13.
30. Al-Masoodi O, Said Gulam Khan H, Baharuddin I, Ismail I. In-vitro Comparison of Antibacterial Activities on Stingless Bee Propolis using Selected Extraction Methods. Compendium of Oral Science. 2022;9(2):23–43.
31. Chourmouziadi Laleni N, Gomes PDC, Gkatzionis K, Spyropoulos F. Propolis particles incorporated in aqueous formulations with enhanced antibacterial performance. Food Hydrocolloids for Health. 2021;1(August):100040.
32. Syukri Y, Purwati R, Hazami N, Anshory Tahmid H, Fitria A. Standardization of Specific and Non-Specific Parameters of Propolis Extract as Raw Material for Herbal Product. EKSAKTA: Journal of Sciences and Data Analysis. 2020;1(1):36–43.
33. Atayoglu AT, Sözeri Atik D, Bölük E, Gürbüz B, Ceylan FD, Çapanoğlu E, et al. Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of the propolis extract prepared with L-lactic acid: An alternative solvent to ethanol for propolis extraction. Food Biosci. 2023;53:1-8.
34. Millones Gómez PA, Tay Chu Jon LY, Maurtua Torres DJ, Bacilio Amaranto RE, Collantes Díaz IE, Minchón Medina CA. Antibacterial, antibiofilm, and cytotoxic activities and chemical compositions of Peruvian propolis in an in vitro oral biofilm. F1000Res. 2021;10:1093;1-23.
35. Fathi Hafshejani S, Lotfi S, Rezvannejad E, Mortazavi M, Riahi-Madvar A. Correlation between total phenolic and flavonoid contents and biological activities of 12 ethanolic extracts of Iranian propolis. Food Sci Nutr. 2023 Jul 21;11(7):4308–25.
36. Becerra TB, Calla-Poma RD, Requena-Mendizabal MF, Millones-Gómez PA. Antibacterial Effect of Peruvian Propolis Collected During Different Seasons on the Growth of Streptococcus Mutans. Open Dent J. 2019;13(1):327–31.
37. Eloff JN. Avoiding pitfalls in determining antimicrobial activity of plant extracts and publishing the results. BMC Complement Altern Med. 2019 Dec 22;19(1):106.
38. Hernández Zarate MS, Abraham Juárez M del R, Cerón García A, Ozuna López C, Gutiérrez Chávez AJ, Segoviano Garfias J de JN, et al. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. Food Science and Technology (Brazil). 2018;38(2):210–5.
39. Almuhayawi MS. Propolis as a novel antibacterial agent. Saudi J. Biol. Sci. 2022;2711):3079–86.
40. López JSA, Lezcano MR, Mandri MN, Gili MA, Zamudio ME. Acción anticariogénica del propóleo. RAAO. 2018;58(1):50-3
41. Gallegos, MT, Vargas Paola, & Rodríguez-García, I. Antibacterial actions of flavonoids. Almería:(2016).
42. Woźniak M, Sip A, Mrówczyńska L, Broniarczyk J, Waśkiewicz A, Ratajczak I. Biological Activity and Chemical Composition of Propolis from Various Regions of Poland. Molecules. 2023;28(1):2-19.
43. Paula VB, Estevinho LM, Cardoso SM, Dias LG. Comparative Methods to Evaluate the Antioxidant Capacity of Propolis: An Attempt to Explain the Differences. Molecules. 2023;28(12):1–23.
44. Srinivas S, Jibhkate N. G, Baranwal R, Avinash A, & Rathi S. Propylene glycol: a new alternative for an intracanal medicament. Journal of International Oral Health. 2016; 8(5): 611-14.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

IX. ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia.

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	METODOLOGÍA
Problema general	**Objetivo general**	**Hipótesis general**	Diseño de investigación: Experimental *in vitro*, prospectivo y transversal. Muestra: Las cepas cultivadas en cada placa petri (n=5) contenían cuatro pocillos correspondientes a cada pasta (PE1, PE2, Pasta triple antibiótica, PRG) distribuidos equitativamente. El experimento se repitió tres veces. Muestreo: No probabilístico por conveniencia. Técnica: Experimental. Instrumentos: • Agitador Orbital • Rotavapor • Estufa • Agitador vortex • Espectrofotómetro • Sonicador
¿Cuál es el perfil fitoquímico y potencial antibacteriano del extracto alcohólico derivado del propóleo peruano contra *Enterococcus Faecalis*?	Determinar el perfil fitoquímico y potencial antibacteriano del extracto alcohólico derivado del propóleo peruano contra E*nterococcus Faecalis.*	H0. El extracto de propóleo no posee efectividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis.* H1. El extracto alcohólico de propóleo tiene actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis.*	
Problemas específicos	**Objetivos específicos**	**Hipótesis específicas**	
1. ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de propóleo frente a *Enterococcus faecalis*?	1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) del extracto de propóleo frente a *Enterococcus faecalis*.	H_1 El extracto alcohólico de propóleo tiene alto contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. H_2 El extracto alcohólico de propóleo tiene actividad antimicrobiana frente a *Enterococcus faecalis.* H_3 No existen diferencias entre la efectividad antimicrobiana de la pasta intraconducto a base de extracto alcohólico de propóleo y la pasta triple antibiótica.	
2. ¿Cuál es la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de propóleo frente a *Enterococcus faecalis*?	2. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto de propóleo frente a *Enterococcus faecalis*.		
3. ¿Cuál es el efecto antimicrobiano de una pasta a base de propóleo frente *Enterococcus faecalis*?	3. Determinar el efecto antimicrobiano de una pasta a base de propóleo frente *Enterococcus faecalis*.		
4. ¿Existen diferencias del efecto antimicrobiano de una pasta a base de propóleo y la pasta triple antibiótica frente a *Enterococcus faecalis*?	5. Comparar el efecto antimicrobiano de una pasta a base de propóleo y la pasta triple antibiótica frente a *Enterococcus faecalis*.		

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexo 2. Tabla de operacionalización de variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	CATEGORÍA O VALOR	TIPO Y ESCALA DE MEDICIÓN
Pasta antibiótica *(Variable independiente)*	Es la combinación de una o más medicamentos que potencian su efecto antibacteriano, con el fin de inhibir y destruir microorganismos del tratamiento endodóntico.	Pastas con propiedades antimicrobianas contra *Enterococcus faecalis.*	-	Composición química	(1) Extracto de propóleo (2) Pasta triple antibiótica	Cualitativa nominal dicotómica
Efecto antimicrobiano *(Variable dependiente)*	Actividad antimicrobiana que produce la muerte de una bacteria.	Efecto que produce la muerte de una bacteria del *Enterococcus faecalis.*	Concentración mínima inhibitoria	Concentración mínima que inhibe crecimiento bacteriano.	mg/ml	Cuantitativa de razón continua
			Concentración mínima bactericida	Concentración mínima que destruye el crecimiento bacteriano.	mg/ml	Cuantitativa de razón Continua
			Método de difusión en pozo de agar	Medición del diámetro de los halos para ver la inhibición de la bacteria alrededor del pozo.	mm	Cuantitativa de razón continua

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexo 3. Instrumento de recolección de datos.

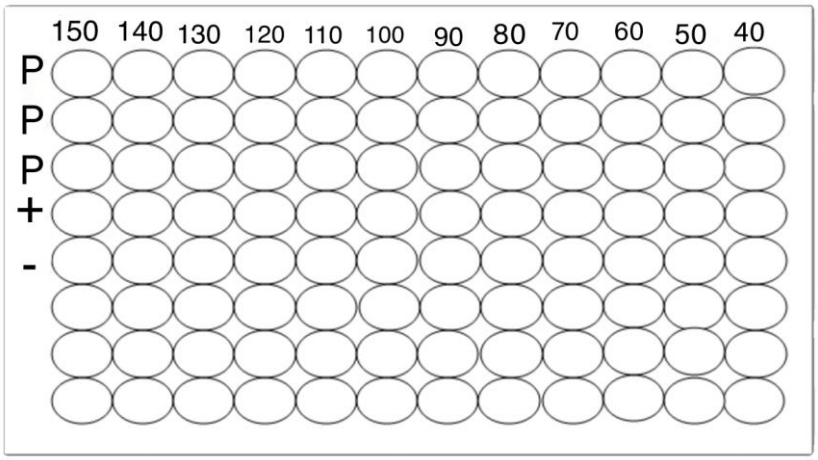
FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Concentración mínima inhibitoria

Realizado en: _____ **Fecha:** _____

Operador: _____

Experimento ____



MIC: _____

Concentración mínima bactericida

Realizado en: _____ **Fecha:** _____

Operador: _____

Numero de placas petri	Concentraciones	Crecimiento bacteriano
1	60 mg/ml	+
2	70mg/ml	+
3	80mg/ml	+
4	90mg/ml	+
5	100mg/ml	+
6	110mg/ml	+
7	120mg/ml	+
8	130mg/ml	-
9	140mg/ml	-
10	150mg/ml	-
11	160mg/ml	-
12	170mg/ml	-
13	180mg/ml	-
14	190mg/ml	-
15	200mg/ml	-

+: Indica presencia de colonias bacterianas

-: Indica ausencia de colonias bacterianas

MBC: _____

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

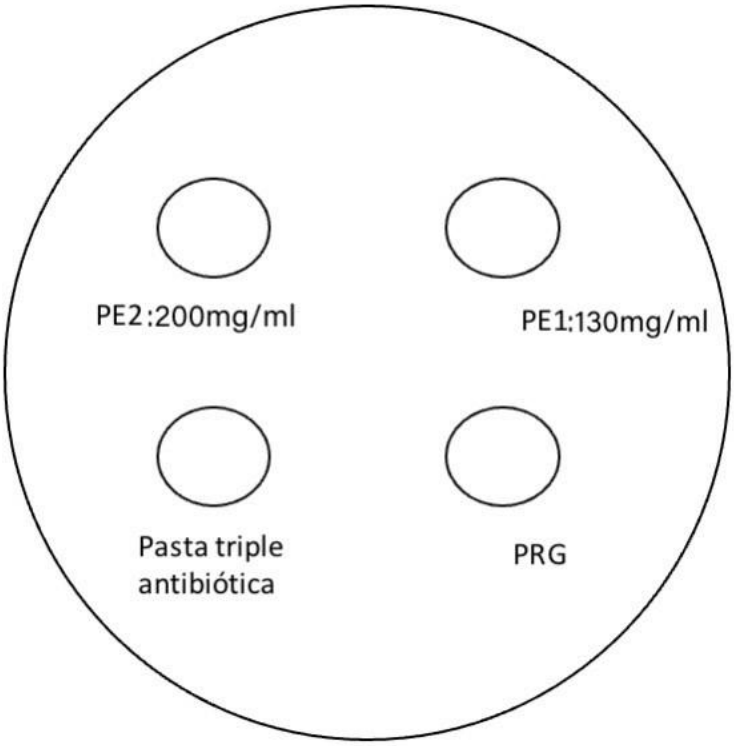
TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Prueba de difusión en pozos de agar

Realizado en: _____ Fecha: _____

Operador: _____

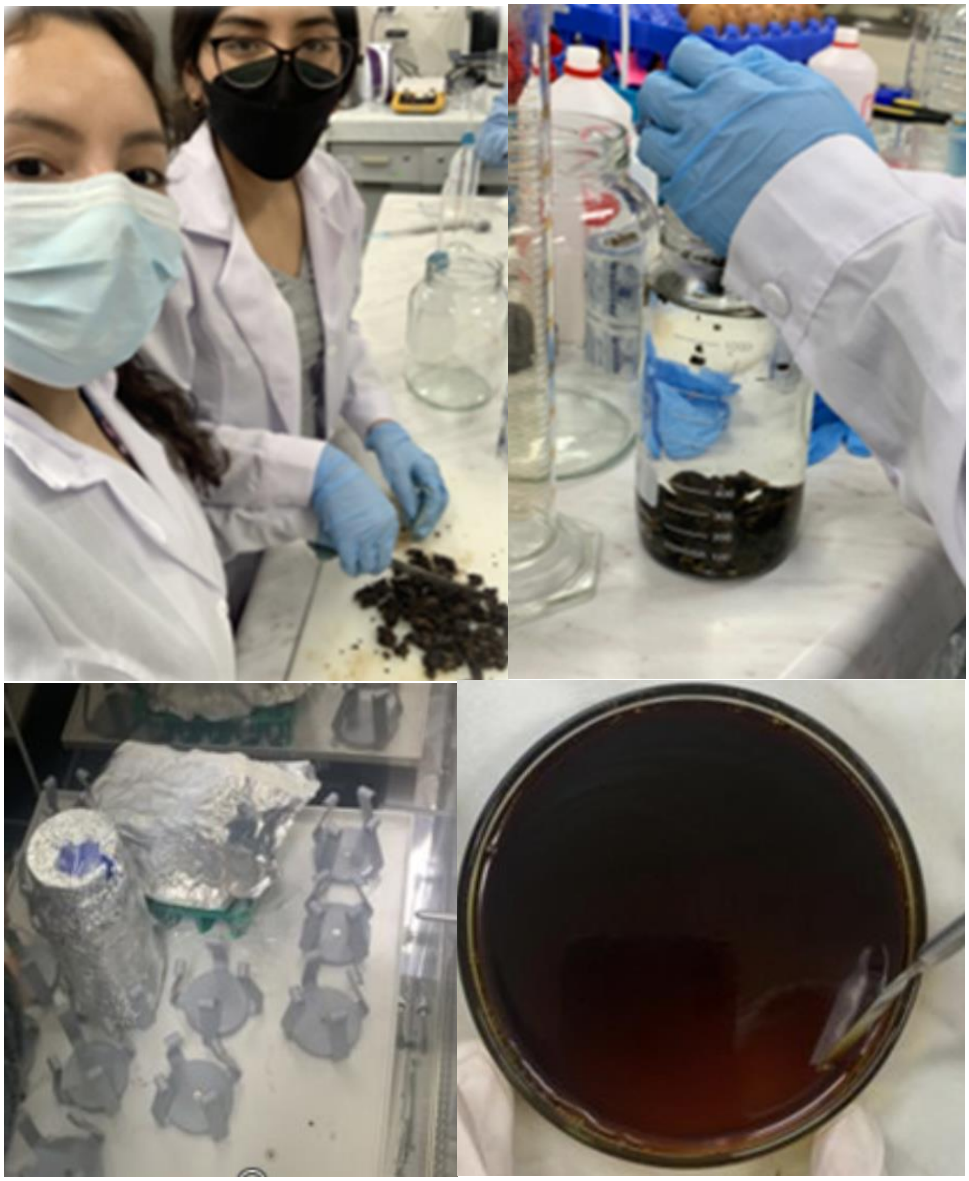
Experimento ___



Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

Anexo 4. Evidencia de ejecución.

Realización del extracto



Ensayos de solubilidad y perfil fitoquímico



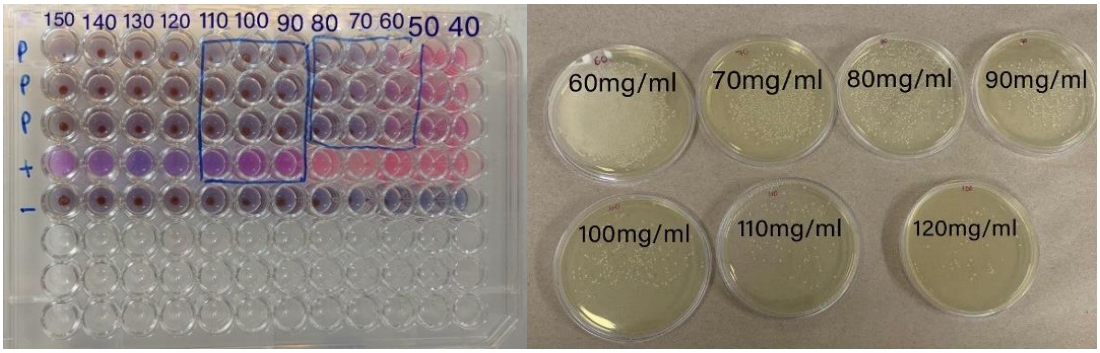
Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

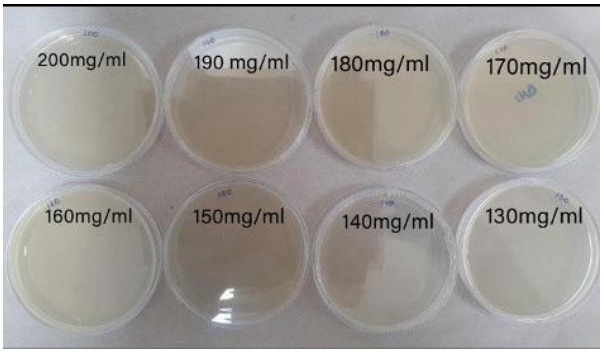


Cuantificación de fenoles y flavonoides



Concentración mínima inhibitoria y bactericida

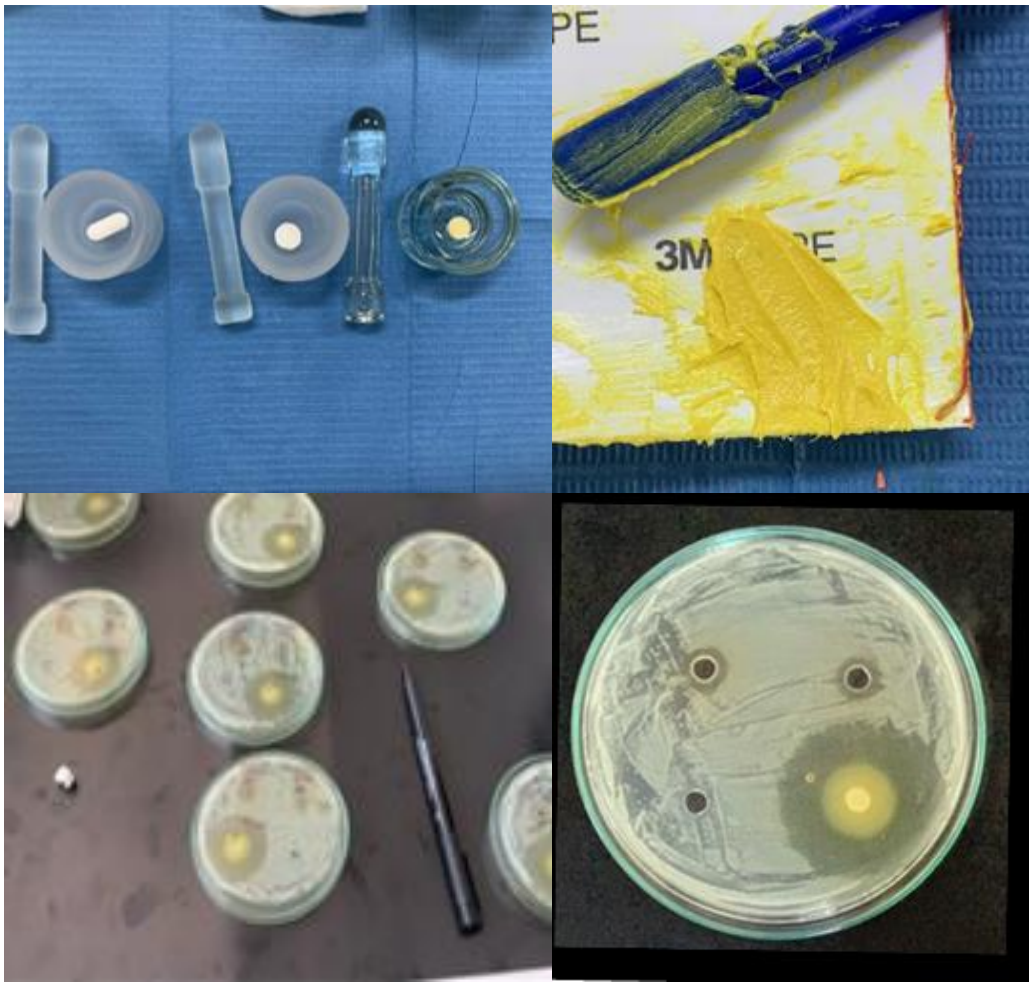




Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Preparación de pasta triple antibiótica y ensayo de difusión en agar con pozos



Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexo 5. Ficha técnica de INS.

	REGISTRO FICHA NET INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Clase de Articulo

Materia prima

ID

Nombre

Propóleo

Denominación

Propóleo

Características

Material resinoso de color marrón oscuro , de olor sui generis, de composición coompleja, fabricado por las abejas.

Documentos

Presentación	**Peso Molecular**
Gramos	**NO APLICA**
Porcentaje de Pureza	**Fórmula**
NO APLICA	**NO APLICA**
Densidad	**PH**
NO APLICA	**NO APLICA**
Temperatura	**Fecha de Vencimiento**
NO APLICA	**NO APLICA**

Observación

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexo 6. Resolución Directoral de aprobación de la Carrera

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

RESOLUCIÓN DIRECTORAL DE ACEPTACIÓN DEL PROYECTO DE TESIS Y NOMBRAMIENTO DEL ASESOR

RESOLUCIÓN DIRECTORAL DE LA CARRERA DE ESTOMATOLOGÍA Nº 094-DACE-DAFCS-U. CIENTÍFICA-2022

Lima, 06 de setiembre de 2022

VISTO:
La solicitud de él/la tesista, asesor/a y la evaluación del Responsable de Investigación de la Carrera de Estomatología y de acuerdo a la RESOLUCIÓN DIRECTORAL No. 012-DGIDI-CIENTIFICA-2021 sobre Normas de precisiones de exoneración del Comité de Ética. Se aprueba el registro **Nº PRE-8-2022-00097** del proyecto de Tesis Titulado: **"EFECTO ANTIMICROBIANO DE UNA PASTA INTRACONDUCTO A BASE DE PROPÓLEO FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*"** presentado por **PAMELA LEONOR ESPINOZA SALAS y ANDREA YOLANDA MUNSIBAY FORONDA.**

CONSIDERANDO:
Que, de acuerdo con el Reglamento General de la Universidad Científica del Sur y los reglamentos de pre/posgrado para obtener el Título de **CIRUJANO DENTISTA** en la Carrera de Estomatología de la Universidad Científica del Sur, se debe desarrollar un trabajo de investigación.

Que, de acuerdo con la normativa vigente de la Universidad Científica del Sur, en uso de las atribuciones conferidas al Director Académico de Carrera.

SE RESUELVE:

ART. 1°: APROBAR E INSCRIBIR el Proyecto de Tesis titulado: **"EFECTO ANTIMICROBIANO DE UNA PASTA INTRACONDUCTO A BASE DE PROPÓLEO FRENTE A *ENTEROCOCCUS FAECALIS*"** de **PAMELA LEONOR ESPINOZA SALAS y ANDREA YOLANDA MUNSIBAY FORONDA** con registro: **Nº PRE-8-2022-00097** y establecer la vigencia de aprobación de este documento de dieciocho (18) meses (hasta el 05 de marzo de 2024), periodo en el que puede desarrollarse el proyecto de investigación.

ART. 2°: NOMBRAR asesora del trabajo de tesis señalado, a la **Mg. Esp. Cinthya Ruth Chipana Herquinio.**

Regístrese, comuníquese y archívese.

CARRERA DE ESTOMATOLOGÍA DIRECCIÓN ACADÉMICA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Dr. Claudio Peña Soto
Director Académico de la Carrera de Estomatología

T // (511) 610 6738
informes@cientifica.edu.pe
cientifica.edu.pe

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Anexo 7. Evidencia de envío a revista.

Brazilian Dental Journal

From: **Carlos Feitosa** onbehalfof@manuscriptcentral.com
Subject: Brazilian Dental Journal - Manuscript ID BDJ-2024-6079
Date: 10 May 2024 at 15:41
To: gabrieln_b@yahoo.com
Cc: andreamunsibay123@gmail.com, pamelaespinozasalas@gmail.com, cchipanahe@cientifica.edu.pe, rolaecheaa@cientifica.edu.pe, alovera@cientifica.edu.pe, gabrieln_b@yahoo.com

CF

10-May-2024

Dear Mr. Nima:

Thank you for submitting your manuscript entitled Phytochemical screening and antibacterial potential of Peruvian propolis extract against Enterococcus faecalis" to the Brazilian Dental Journal. Your manuscript ID is BDJ-2024-6079.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo.

In accordance with the Brazilian Dental Journal's policies referring to the review process that precedes publication, all manuscripts accepted for publication undergo a Technical Review, which includes revision of language and scientific writing style, formatting corrections and technical editing to fit the manuscript into Journal's standards, and preparation of galley proofs.

The Technical Review Fee ranges from R$ 550,00 Reais Brasileiros (for Brazilian authors) or U$ 300 American dollars (for foreign authors) and will be charged to the corresponding author, even if only minor corrections to the manuscript are needed.

For foreign authors, the Technical Review Fee should be paid upon acceptance of the manuscript for publication, using the PAYPAL ONLINE MONEY TRANSFER SYSTEM (www.paypal.com).

For both Brazilian and foreign authors, more detailed explanation will be provided if the manuscript is accepted.

If you DO NOT agree with these conditions, please inform your decision to withdraw the manuscript from the review process immediately.

Sincerely,
Brazilian Dental Journal Editorial Office

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis