



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

EFECTO INHIBITORIO DE LA  
FRACCIÓN METANÓLICA DEL  
PROPÓLEO DE OXAPAMPA EN  
DIFERENTES GENOTIPOS AISLADOS  
DE *Streptococcus mutans* DE NIÑOS CON  
PROBLEMAS DE CARIES

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

MAYRA LIZETH VARGAS GIL

LIMA - PERÚ

2022



**ASESORA:**

Msc. Dora Maurtua Torres

## **JURADO EXAMINADOR**

DR. JASMÍN ELENA HURTADO CUSTODIO  
PRESIDENTE

MG. CARLOS VLADIMIR ESPINOZA MONTES  
VOCAL

MG. RUTH LILIANA CRISTOBAL DELGADO  
SECRETARIA

## **Dedicatoria.**

*En primer lugar, a Dios, por guiarme  
por el buen camino y darme fuerzas para seguir hacia  
adelante a pesar de los problemas y siempre manteniendo  
la humildad.*

*A mis padres Hermenegildo Vargas y  
Margarita Gil, Por darme lo mejor de este mundo “su  
amor, sus valores y mi educación”. Por su apoyo, consejos  
y rezos para que logre todos mis objetivos, muchas gracias  
por todo, los amo.*

*A mi hermano Mitchel Vargas y a mi  
cuñada Evelyn Sencia, por ser mis amigos y compañeros  
eternos porque sé que puedo contar con ustedes en todo  
momento.*

*A mi novio Joel Agreda, por estar  
conmigo en todo momento, brindándome su amor y  
palabras de apoyo para la culminación de este proyecto.*

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesora la Msc Dora Maurtua, por su guía y confianza en el desarrollo de esta tesis y por darme la oportunidad de ser parte de un equipo multidisciplinario.

Al Dr. Pablo Millones por brindarme la fracción metanólica del propóleo y a la Dra. Lidia Yileng por dedicarme un poco de su tiempo y por brindarme asesoramiento en el campo en que se desempeñan.

A la Dra. Carmen Kanashiro docente del Departamento Académico de Estomatología del Niño y Adolescente por permitirme realizar la toma de muestra bucal en los niños diagnosticados con caries.

A la Dra. Patricia Sheen y a la Bch. Adriana Ochoa por su asesoramiento en la técnica de PCR convencional y así poder realizar la genotipificación de este proyecto.

A mis amigas Evelyn Amaranto y a Rosemary Llaque con quienes he compartido tantos buenos momentos como malos juntos, gracias por hacer del Laboratorio de Bacteriología un lugar acogedor. Me siento muy afortunada de conocerlas, porque no sólo son excelentes personas sino grandes profesionales.

## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

Ciencia activa

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC)

Convenio N° 163-2016-UPCH

# EFFECTO INHIBITORIO DE LA FRACCIÓN METANÓLICA DEL PROPÓLEO DE OXAPAMPA EN DIFERENTES GENOTIPOS AISLADOS DE *Streptococcus mutans* DE NIÑOS CON PROBLEMAS DE CARIES

## INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1

[repositorio.uss.edu.pe](http://repositorio.uss.edu.pe)

Fuente de Internet

2%

2

[repositorio.unne.edu.ar](http://repositorio.unne.edu.ar)

Fuente de Internet

1%

3

[repositorio.uap.edu.pe](http://repositorio.uap.edu.pe)

Fuente de Internet

1%

4

[bibliotecadigital.umsa.bo:8080](http://bibliotecadigital.umsa.bo:8080)

Fuente de Internet

1%

5

[www.noticiasdislocadas.com](http://www.noticiasdislocadas.com)

Fuente de Internet

1%

6

[www.scielo.org.co](http://www.scielo.org.co)

Fuente de Internet

1%

7

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

Fuente de Internet

1%

8

[www.monografias.com](http://www.monografias.com)

Fuente de Internet

1%



## INDICE DE CONTENIDO

Resumen	
Abstract	
1. Introducción	1
2. Planteamiento de la investigación	4
2.1.Planteamiento del Problema	4
3. Marco teórico	6
3.1.Caries dental	6
3.2.Biofilm dental cardiogénico	7
3.3.Rol de la sacarosa	7
3.4. <i>Streptococcus mutans</i>	8
3.5.Clasificación de <i>Streptococcus mutans</i>	9
3.6.Factores de virulencia de <i>Streptococcus mutans</i>	11
3.7.Propóleo	12
3.8.Composición del propóleo	13
3.9.Actividad antioxidante del propóleo	14
3.10. Actividad fungicida del propóleo	14
3.11. Actividad antibacterianos del propóleo	15
3.12.El propóleo como anticariogénico	15
4. Justificación del estudio	17
5. Hipótesis	19
5.1.Hipótesis nula	19
5.2.Hipótesis alternativa	19
6. Objetivos	20
6.1.Objetivo general	20
6.2.Objetivos específicos	20
7. Variables de estudio	21
7.1.Variable dependiente	21
7.2.Variable independiente	21
7.3.Variable de control	21
8. Materiales y metodología	22

8.1.Diseño de estudio	22
8.2.Muestra	22
8.3.Criterios de inclusión	22
8.4.Criterios de exclusión	23
8.5.Determinación de la muestra	23
8.6.Toma de muestra	23
8.7.Aislamiento e Identificación bioquímica de <i>Streptococcus mutans</i>	25
8.7.1. Medio de cultivo	25
8.7.2. Siembra de las muestras	26
8.7.3. Coloración Gram de colonias con características de <i>Streptococcus</i> del grupo mutans	27
8.8. Identificación bioquímica de los <i>Streptococcus</i> del grupo mutans.	28
8.8.1. Preparación de los caldos de fermentación para carbohidratos manitol, sorbitol y rafinosa.	28
8.8.2. Mantenimiento de las cepas caracterizadas bioquímicamente.	30
8.9. Determinación de los genotipos por PCR convencional.	30
8.10. Fracción clorofórmica del propóleo	34
8.11. Evaluación del efecto inhibitorio del residuo clorofórmico del propóleo de Oxapampa sobre las diferentes cepas aisladas de <i>Streptococcus mutans</i>	35
8.12. Consideraciones éticas	37
8.13. Análisis estadístico	37
9. Resultados	38
10. Discusiones	42
11. Conclusiones	45
12. Recomendaciones	46
13. Bibliografía	47
14. Anexo	

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Especies de <i>Streptococcus mutans</i> con sus respectivos serotipos y los diferentes carbohidratos de su pared celular.	10
<b>Tabla 2</b>	Composición del propóleo	13
<b>Tabla 3</b>	Fórmula para la preparación para un litro de Agar mitis salivarius	25
<b>Tabla 4</b>	Comparación del promedio, desviación estándar y mediana de los halos de inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC y muestras de pacientes de niños con problemas de caries.	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Tubos de 16x100 los cuales contenían thioglicolato en un volumen de 3 ml.	24
<b>Figura 2</b>	Toma de muestra usando palillos dentales e hisopos estériles en presencia del odontólogo tratante.	24
<b>Figura 3</b>	Agar Mitis Salivarius + Bacitracina + telurito + sacarosa 10% en placa Petri	26
<b>Figura 4</b>	placas de Agar Mitis Salivarius incubadas a 37°C por 48 horas en jarras de anaerobiosis con bolsas de anaerobiosis y con su respectivo indicador	27
<b>Figura 5</b>	Coloración Gram de todas las placas previamente sembrada en anaerobiosis total.	27
<b>Figura 6</b>	Bacterias del grupo Mutans son Gram positivas con forma cocácea y agrupadas en cadenas	28
<b>Figura 7</b>	Filtrado de los 10 ml en el recipiente que contiene los 90 ml de caldo nutritivo.	29
<b>Figura 8</b>	Viales con 1 ml de manitol, sorbitol y rafinosa a los cuales se le agregó rojo de metilo, viales del lado izquierdo: cepa aislada, no fermenta los tres carbohidratos, viales del lado derecho: cepa ATCC 25175, si fermentan los tres carbohidratos.	29
<b>Figura 9</b>	Primers SMUT'5 y SMUT'3 colocadas en el Thermocycle	33
<b>Figura 10</b>	Mix de primers de los serotipos (C,F,E) en el Thermocycle del lado izquierdo, primers del serotipo K en el Thermocycle del lado derecho	33
<b>Figura 11</b>	Inoculo a la escala de Mac Farland de 0,5	36
<b>Figura 12</b>	Palcas sembradas y con sus respectivos discos de papel de filtro en microaerofilia	37
<b>Figura 13</b>	Electroforesis en agarosa 1% de los productos de amplificación con los primers Smut. Fragmento de 137 pb.	38
<b>Figura 14</b>	Electroforesis en agarosa 1% de los productos de amplificación con los primers CEF y K. Fragmento de 727 pb genotipo C, 517 pb genotipo e y 316 pb genotipo f.	39
<b>Figura 15</b>	Porcentaje de genotipos de <i>Streptococcus mutans</i> de niños con problemas de caries en donde se tiene que el genotipo C es 100%, el genotipo E es 21.58%, el genotipo F es 14.39% y el genotipo K es 0%	39
<b>Figura 16</b>	Porcentaje de genotipos múltiples en donde se tiene que los genotipos C, E es 21.73% y el genotipo C, F es 14.49% y los genotipos individual C es de un 63.77%, mientras que K fue de un 0%	40

## RESUMEN

La caries dental es una enfermedad de etiología bacteriana, la cual consiste en la destrucción de los tejidos dentales debido a la presencia de ácidos producidos por las bacterias orales tales como *Streptococcus mutans*. El propóleo, es producido por *Apis mellifera* (abejas), es un componente conocido por su acción bactericida, actualmente se conocen hasta 200 compuestos diferentes identificados los cuales tienen relación con el medio ambiente. En el Perú, se ha estudiado el propóleo en diferentes regiones donde existen apicultores y en el trabajo del Dr. Pablo Millones, encontró que la fracción metanólica del propóleo de la región de Oxapampa departamento de Pasco, tuvo una excelente actividad antibacteriana frente las bacterias ATCC de *Streptococcus gordonii* y *Fusobacterium nucleatum*. Por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa en diferentes genotipos aislados de *Streptococcus mutans* de niños con problemas de caries. La fracción metanólica del propóleo de Oxapampa fue obtenida por cortesía del doctor Pablo Millones Gómez. Se recolectaron 150 muestras de hisopado oral de niños diagnosticados con caries, los cuales fueron sembradas e identificadas por pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos, seguidas por PCR convencional, utilizando los primers específicos para confirmar la especie y determinar el genotipo de cada una de ella. En cada una de las pruebas se utilizó como control positivo a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Después de la identificación se procedió a enfrentar las cepas de *S. mutans* y el control de la ATCC 25175 a la fracción metanólica por el método de difusión en disco en el medio de cultivo BHA, para determinar la susceptibilidad de las bacterias aisladas y cepa control a la fracción metanólica. Los datos obtenidos

(medida de los halos de inhibición) fueron procesados utilizando el método estadístico T - student. Teniendo como resultado la medida de los halos de inhibición en milímetros frente a la fracción metanólica (9 a 24 mm) enfrentados a *S. mutans* mostraron mayor diámetro en relación a los enfrentados con la cepa ATCC 25175 (10 a 10.5 mm) además, la fracción metanólica responde de manera similar sin diferencia significativa frente a la clorhexidina  $p = 0.85$  a diferencia de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y las muestras de niños diagnosticados con caries, muestran diferencias significativas tanto para clorhexidina como para la fracción metanólica del propóleo  $p = 0.005$ , a su vez en la genotipificación se encontró que el 100% pertenecía al genotipo C, el 21.58% al genotipo E y el 14.39% al genotipo F y no se encontró el genotipo K y entre ellos se observaron genotipos múltiples C, E con un 21.73% y C, F con un 14.49%. Se concluye que la fracción metanólica del propóleo presenta actividad inhibitoria en las 138 cepas aisladas y genotipificadas en niños diagnosticados con caries.

**PALABRAS CLAVE:** *Streptococcus mutans* (DeCS), extracto propolis (DeCS), caries dental (DeCS), inhibición bacteriana (DeCS)

## ABSTRACT

Dental caries is a bacterial etiology disease, which consists of the destruction of dental tissues due to the presence of acids produced by oral bacteria such as *Streptococcus mutans*. Propolis, produced by *Apis mellifera* (bee), is a component known for its bactericidal action, and up to 200 different identified compounds which are related to the environment. In Peru, propolis has been studied in different regions where there are beekeepers and in the work of Dr. Pablo Millones, he found that the methanolic fraction of propolis from the Oxapampa region, department of Pasco, had excellent antibacterial activity against ATCC bacteria. of *Streptococcus gordonii* and *Fusobacterium nucleatum*. Therefore, the objective of this study was to determine the inhibitory effect of the methanolic fraction of Oxapampa propolis on different genotypes of *Streptococcus mutans* isolated from children with caries problems. The methanolic fraction of Oxapampa propolis was obtained courtesy of Dr. Pablo Millones Gómez. 150 oral swab samples were collected from children diagnosed with caries, they were seeded and identified by biochemical tests of carbohydrate fermentation, followed by conventional PCR, using specific primers to confirm the species and determine the genotype of each one of them. In each of the tests, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was used as a positive control. After identification, the strains of *S. mutans* and the ATCC 25175 control were compared to the metabolic fraction by the disk diffusion method in trypticase soy agar, to determine the susceptibility of isolated bacteria and control strain to the metabolic fraction. The data obtained (measurement of the zone of inhibition) were processed using the T-student statistical method. Having as a result the measurement of the zone of inhibition **in** millimeters against the metabolic fraction (9 to 24 mm) faced

with *S. mutans* showed a greater diameter in relation to those faced with the ATCC 25175 strain (10 to 10.5 mm). In addition, the methanolic fraction responds similarly without significant difference against chlorhexidine  $p = 0.85$ , although *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and samples from children diagnosed with caries, show significant differences both for chlorhexidine and for the methanolic fraction of propolis  $p = 0.005$ . Meanwhile, in the genotyping it was found that 100% belonged to genotype C, 21.58% to genotype E and 14.39% to genotype F and genotype K was not found and among them multiple genotypes C, E were observed with 21.73% and C, F with 14.49%. It is concluded that the methanolic fraction of propolis presents inhibitory activity in the isolated and genotyped strains in 138 children diagnosed with caries.

**KEY WORDS:** *Streptococcus mutans* (MeSH), extract propolis (MeSH), dental caries (MeSH), bacterial inhibition (MeSH),



# 1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad de etiología bacteriana considerada la más antigua de la humanidad, la cual consiste en la destrucción de los tejidos dentales debido a la presencia de ácidos producidos por las bacterias de la placa depositada en las superficies dentales, es considerada en muchas partes del mundo como un problema de salud pública debido a que se considera una de las principales causas de pérdida dental, y está muy influenciado por el estilo de vida tales como la alimentación, el huésped, el tiempo y los microorganismos<sup>1</sup>, todo esto en conjunto afecta la calidad de vida de los individuos que lo padecen.

La presencia de microorganismos tiene un rol fundamental para el inicio y sucesión de las lesiones producidas por las caries. De hecho, se trata de una enfermedad infecciosa polimicrobiana<sup>2</sup>, donde cada especie bacteriana individual puede contribuir colectivamente a la cariogenicidad total de la biocomunidad de la placa dental (biofilm dental) asociada a caries<sup>3</sup>. Por ello, es importante conocer y entender el rol de las especies bacterianas responsables de la progresión de las caries dentales.

A medida que la lesión de caries progresa, se da una transición de bacterias anaerobias facultativas Gram-positivas, que predominan en la etapa inicial de la lesión, a bacterias anaerobias estrictas Gram-positivas y Gram-negativas que predominan en lesiones de caries avanzadas<sup>4</sup>. La bacteria más asociada con el inicio y el avance de la carie es:

*Streptococcus mutans*, quien es considerada como el principal agente etiológico de la lesión de caries, especialmente en las primeras etapas<sup>5</sup>. *S. mutans*, serotipo c, es

la especie con mayor frecuencia encontrada en humanos. Este microorganismo se encuentra en el biofilm de la placa bacteriana supragingival y aprovecha la presencia de carbohidratos especialmente de la sacarosa, glucosa y fructosa, para la producción de ácido, llegando así a producir la desmineralización del esmalte dental.

Existe un gran interés en estudiar productos naturales medicinales que posean propiedades farmacológicas antibacterianas, con el fin de controlar la formación de biopelícula con la finalidad de reducir la presencia de agentes patógenos y para prevenir la caries dental.

El uso de las plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, de ellas se obtienen innumerables sustancias químicas, vegetales que pueden considerarse fármacos y son empleados en diferentes países<sup>6</sup>. En el campo de la práctica odontológica, las plantas medicinales han tenido todo tipo de uso, en especial en la parte preventiva como aditivos en los diversos productos de higiene oral con propiedades anti-inflamatorias y antibacterianas, siendo esta última característica la más estudiada. Sin embargo, debido a la gran biodiversidad del Perú, muchas de estas plantas no se han estudiado o recién se están empezando a estudiar<sup>7</sup>.

Numerosos estudios científicos sobre el propóleo, han revelado su compleja composición describiendo más de 100 componentes que actúan en sinergismo. Los más importantes son polifenoles, entre los que se destacan los flavonoides (galangina y pinocembrina y derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y cafeico), componentes a los que se debe gran parte de la actividad biológica y terapéutica, la cual varía en función del origen geográfico<sup>8</sup>. Hasta ahora los principales usos que

se le ha dado al propóleo son: la capacidad antimicrobiana, cicatrizante y anti-inflamatoria<sup>7,9</sup>. Además, algunos autores han sugerido que el propóleo inhibe la actividad enzimática de varias proteínas que son necesarias para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos orales responsables del desarrollo de la caries dental como el *Streptococcus mutans* y en menor grado el *Lactobacillus acidófilo*<sup>10,11</sup>.

Es así que el presente estudio propone enfrentar la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa sobre los diferentes serotipos de *Streptococcus mutans* aislados de niños con problemas de caries.

## **2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **2.1. Planteamiento del Problema**

En la cavidad oral, existen aproximadamente unas 600 especies bacterianas, de las cuales solo se identifican 50 a 150<sup>12</sup>. Existen además zonas que son susceptibles a ser colonizadas superficialmente por las bacterias formando de este modo nichos en: la mucosa oral, el dorso de la lengua, surco gingival, superficies dentales, restauraciones fijas o removibles y la saliva<sup>12</sup>. Los tejidos duros del diente actúan como una barrera mecánica que evita la invasión microbiana hacia la pulpa, pero cuando ésta barrera se destruye de forma parcial o completa causa los problemas más prevalentes en la cavidad oral como es la caries o la enfermedad periodontal<sup>13</sup>.

La caries dental no tratada tanto para adultos, niños y adolescentes, pueden causar la destrucción progresiva de los dientes, la reparación y el reemplazo de los dientes cariados es costosa, tanto en tiempo y dinero, y es una gran pérdida de recursos para el sistemas de salud, por lo que se recurre generalmente al uso de flúor y a la inclusión de este en diversos productos naturales como enjuagues bucales, pastillas, barnices y geles<sup>14</sup>.

Actualmente, se está investigando nuevas alternativas de tratamientos antibacterianos utilizando productos naturales como una solución a los problemas odontológicos<sup>15</sup>. Varios estudios demostraron que el propóleo puede ser una solución a diversos problemas de salud oral, debido a su acción antibacteriana contra bacterias Gram positivas y su capacidad de penetrar el biofilm y evitar su desarrollo<sup>15</sup>. Esto se debe a la presencia de flavonoides que son metabolitos

secundarios los cuales son los ingredientes más abundantes y han sido reportados como los responsables de su efecto biológico y actividades farmacológicas<sup>16</sup>.

Según la publicación de Pablo Millones el propóleo de Oxapampa se fracciona en tres: fracción eter, fracción de diclorometano y fracción metanólica. Siendo la fracción metanólica la que tiene mayor actividad frente a las bacterias ATCC de *S. gordonii* y *F. nucleatum*<sup>17</sup>. Por lo que en el presente estudio propone evaluar el efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa sobre los diferentes genotipos aislados de *Streptococcus mutans* de pacientes diagnosticados con caries y que asistieron a la Clínica Dental Docente Cayetano Heredia.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1. Caries dental

La caries dental es uno de los mayores problemas de la salud pública a nivel mundial, El reporte de la OMS del año 2019, manifiesta que la caries en dientes permanentes es el trastorno más frecuente y se calcula que lo padecen 2000 millones de personas<sup>18</sup> y que 520 millones de niños sufren de caries en los dientes de leche<sup>19</sup>. La caries es una enfermedad infectocontagiosa producida por la adherencia de bacterias en la superficie dentaria, una de estas bacterias que participa activamente en la formación del biofilm son los del género *Sreptococcus* del grupo *mutans* que juega un papel muy importante en la desmineralización de la superficie del diente, además de *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*, los cuales también están asociadas a las caries<sup>20</sup>.

Dichas bacterias cariogénicas aprovechan los diferentes tipos de carbohidratos (sacarosa, glucosa y fructosa) provenientes de la alimentación diaria para la producción de ácido, teniendo como resultado la destrucción progresiva de la estructura del diente<sup>21</sup>.

De acuerdo con el reporte del Ministerio de Salud del 2013, se menciona que la prevalencia de caries en Perú es de un 90.4% siendo un valor elevado para Latinoamérica. En este reporte mencionan que, según el tipo de dentición, la caries dental en piezas temporales fue 60.5% y en piezas permanentes 60.6% además encontraron que la presencia de caries varía entre 87.2% a 91.4% segunda la edad del paciente (8 a 15 años)<sup>14</sup>.

### **3.2. Biofilm dental cariogénico**

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo<sup>22</sup>. Estos biofilm contienen numerosas comunidades de bacterias causantes de enfermedades y su acumulación se ha asociado a la presencia de caries y enfermedades periodontales.

Cabe mencionar que en el interior del biofilm existen diferentes tipos de ambientes, así como diferentes concentraciones de pH, nutrientes y oxígeno. Además, los biofilms son los responsables de la caries y de las enfermedades periodontales, y presentan gran resistencia frente a los antimicrobianos<sup>23</sup>.

La formación del biofilm tiene lugar aún en períodos de ayuno. Por tal motivo, la matriz del biofilm dental en la que están inmersas las bacterias, presentará diferentes texturas, grosor y composición según se forme en ausencia o en presencia de alimentos<sup>24</sup>.

La habilidad de *Streptococcus mutans* de sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa de la dieta a través de las glucosiltransferasa facilita la adhesión y la formación de biofilm dental<sup>25</sup>.

### **3.3. Rol de la sacarosa**

La sacarosa produce cambios bioquímicos y fisiológicos, los cuales son de gran importancia para la formación del biofilm, favoreciendo el crecimiento de especies cariogénicas. Además, la sacarosa se considera el carbohidrato dietético más

cariogénico, ya que es fermentable y también sirve como sustrato para la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS) e intracelulares (IPS) en placas dentales<sup>26</sup>.

### **3.4. *Streptococcus mutans***

Es uno de los principales agentes etiológicos responsables del desarrollo de la caries dental, especialmente en países en vías de desarrollo en donde su prevalencia es alta.

Clarke J en 1924 menciona que *Streptococcus mutans* está relacionado con presencia de lesiones cariosas además de ser un poderoso productor de ácido, el pH original en la boca es de 7 y lo disminuye a pH a 4.2 en aproximadamente 24 horas debido a la fermentación de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina<sup>27</sup>.

*Streptococcus mutans*, son cocos Gram positivas dispuestos en cadena cortas de 4 a 6, los cuales miden de 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, anaerobia facultativa, son patógenos oportunistas en enfermedades humanas como la caries dental y la endocarditis infecciosa<sup>2</sup>, bacteria no móvil, no formadora de esporas además perteneciente al grupo de las bacterias acidolácticas que se encuentra en la cavidad bucal de las personas, formando parte del biofilm dental<sup>28</sup>.

*Streptococcus* del grupo mutans está constituido por siete especies, los cuales son *Streptococcus mutans*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus macacae*, *Streptococcus downei* y ocho genotipos, identificados con las letras "a" hasta la "h". Cabe mencionar que Nakano, *et al* en el 2007 añadieron el genotipo k, muy relacionado con la Endocarditis Bacteriana Subaguda<sup>29</sup>.



La mayoría de *Streptococcus mutans* (genotipo c, e y f), y en menor proporción *Streptococcus sobrinus* (genotipo d y g), son capaces de afectar a los diferentes tipos de superficies de los dientes con el proceso carioso, especialmente en fosas, fisuras y superficies lisas<sup>30</sup>.

### **3.5. Clasificación de *Streptococcus mutans***

Mucho antes del desarrollo de las técnicas moleculares, diferentes autores como Nakano y Shibata realizaron pruebas para determinar los serotipos de *S. mutans* y clasificándolos de acuerdo a los antígenos que exhibe en la superficie de sus células al estar en contacto con los anticuerpos de un cierto suero. Las pruebas más comunes son: inmunoblot (conocida como Western blot); ELISA («inmunoensayo ligado a enzimas»), entre otros, actualmente se puede genotipificar mediante primers los cuales tienen una elevada precisión y fiabilidad.

Debido a la composición y a los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, los *Streptococcus* del grupo *mutans* se pueden clasificar en 8 genotipos<sup>31</sup>, siendo el serotipo “c” el más ácido-tolerante, con un grado óptimo de pH 5.0 para la producción de ácido láctico<sup>32</sup>. Es importante estudiar estos diferentes genotipos para comprender de qué manera colonizan y como sus factores de virulencia actúan para producir la enfermedad.

Shibata Y, et al en el 2003 comentan que el progenitor de *Streptococcus mutans* ha sido el serotipo c y que las cepas del serotipo f y e, se han originado por mutaciones del determinante del serotipo c<sup>33</sup>.

Actualmente *S. mutans*, está clasificado en tres serotipos c, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos específicos de los serotipos los cuales están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Recientemente Nakano (2004) designó un nuevo serotipo de *Streptococcus mutans* (serotipo k) el cual se caracteriza por una drástica reducción en la cantidad de cadenas laterales de glucosa<sup>34</sup>, lo que produce un bajo nivel de cariogenicidad debido a las alteraciones de varios antígenos proteicos de su superficie<sup>34</sup>. El serotipo k está presente en la cavidad oral debido a su alta hidrofobicidad y adhesión dependiente de la sacarosa, junto con la expresión de glucosiltransferasas y antígenos proteicos, este serotipo puede sobrevivir en la sangre debido a su menor capacidad fagocítica<sup>35</sup>. Se debe tener especial cuidado con los niños que presentan caries y trastornos cardíacos<sup>36</sup> ya que ellos son susceptibles al defecto del tabique ventricular<sup>37</sup> en la que el serotipo k esta relacionado. La presencia de este nuevo serotipo k, indica un mayor riesgo en estos pacientes, por lo que la bibliografía menciona que sería necesario un enfoque clínico.

**Tabla 1:** Especies de *Streptococcus mutans* con sus respectivos serotipos y los diferentes carbohidratos de su pared celular.

<b>Streptococcus</b>	<b>genotipos</b>	<b>Carbohidratos pared celular</b>
<i>Streptococcus mutans</i>	c, e, f y k	Glucosa y Ramnosa
<i>Streptococcus sobrinus</i>	d, g y h	Glucosa, Galactosa y Ramnosa
<i>Streptococcus cricetus</i>	a	Glucosa, Galactosa y Ramnosa
<i>Streptococcus rattus</i>	b	Glucosa y Ramnosa
<i>Streptococcus ferus</i>	c	¿?
<i>Streptococcus macacae</i>	c	Glucosa y Ramnosa
<i>Streptococcus downei</i>	h	¿?

### 3.6. Factores de virulencia de *Streptococcus mutans*

**Acidogenicidad:** *Streptococcus mutans* puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que descienda el pH y se desmineralice el esmalte dental<sup>31</sup> al igual que la producción de ácido acético, fórmico y etanol.

**Aciduricidad:** Es la capacidad que posee el microorganismo de producir ácido en un medio con pH ácido. *Streptococcus mutans* es más acidúrico que los demás tipos de *Streptococcus*<sup>25</sup>.

**Acidofilicidad:** *Streptococcus mutans* tiene la habilidad de responder rápidamente y eficientemente a grandes cambios en su medio ambiente. Razón por la cual puede resistir la acidez del medio bombeando los protones (H<sup>+</sup>) fuera de la célula. Este es un elemento funcional de dominancia de *Streptococcus mutans* en biofilm dental cariogénico<sup>25</sup>.

Síntesis de glucanos y fructanos: *Streptococcus mutans* por medio de enzimas como glucosiltransferasa y fructosiltransferasas (GTFs y FTFs), de los cuales se producen polímeros de glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a *Streptococcus mutans* a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes<sup>24</sup>.

**Síntesis de polisacáridos intracelulares:** Entre estos polisacáridos intracelulares se encuentra el glucógeno, que sirve como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos períodos aún en ausencia de consumo de azúcar<sup>31</sup>.

**Proteínas de adhesión celular:** Son unas proteínas antigénicas que se encuentran en la cápsula de la pared celular de *Streptococcus mutans* e inician la adhesión a la superficie dental. Lo cual es inusual, debido a que estas se encuentran en otros microorganismos en apéndices como las fimbrias<sup>25</sup>.

### **3.7. Propóleo**

El término propóleo proviene del griego propolis el cual significa "defensa de la ciudad"

En los últimos años ha habido un gran interés por las propiedades del propóleo. El propóleo es una sustancia resinosa y pegajosa natural recolectada y elaborada por las abejas *Apis mellifera*, a partir de las exudaciones de árboles y plantas<sup>38</sup>. Las abejas *Apis mellifera* lo obtienen por adición de cera y secreciones salivales al material resinoso, gomoso o balsámico que recolectan de yemas, brotes y heridas de diversas plantas. En la colmena, las abejas utilizan al propóleo con diversos fines tales como: cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena evitando su descomposición, consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y evitar vibraciones<sup>39</sup>.

La producción del propóleo está en función de la raza de abejas y del ambiente en el cual se desarrolla la actividad apícola. La raza caucásica y los híbridos africanizados, son más propolizadores que otras razas, son pocas las colonias y las abejas de una colmena que colectan propóleo, cerca de 3% de las pecoreadoras realizan este trabajo, el cual es muy desgastante (reduce la vida de la obrera en torno

a 20%), ya que esta operación dura entre 15 y 60 minutos y se realiza en las horas más calientes del día<sup>7</sup>.

### 3.8. Composición del propóleo

La composición química del propóleo es compleja y depende de la flora de la región donde es recolectado, los microorganismos presentes en el entorno geográfico, la técnica de obtención, los factores climatológicos influyen mucho en la actividad antibacteriana que pueda presentar<sup>40</sup>:

**Tabla 2:** Composición del propóleo

<b>ELEMENTOS</b>	<b>PORCENTAJES</b>
Resinas	50-55%
Ceras	30-40%
Aceites esenciales o volátiles	5-10%
Polen	5%
Sustancias orgánicas y minerales	5%

La cera presente en el propóleo no tiene actividad terapéutica probada, y constituyen alrededor del 30-40% del total de la muestra. El resto corresponde a la parte biológicamente activa<sup>41</sup>.

Entre los compuestos orgánicos y minerales se encuentran más de 40 flavonoides (flavonas, flavanoles y flavononas), compuestos fenólicos, aldehídos aromáticos alifáticos, compuestos terpénicos, ácidos grasos, aminoácidos (arginina, prolina), vitaminas (entre ellas, la vitamina A y las vitaminas de grupo B) y oligoelementos (cobalto, cobre, hierro, magnesio, manganeso, selenio, zinc). Se han logrado identificar hasta 200 componentes diferentes y a muchos de ellos se les atribuyen importantes acciones farmacológicas<sup>42</sup>.

### **3.9. Actividad antioxidante del propóleo**

La capacidad antioxidante del propóleo puede estar relacionada con algunos de sus efectos biológicos como la quimio prevención. Los flavonoides son poderosos antioxidantes capaces de eliminar los radicales libres y proteger la membrana celular contra la peroxidación lipídica<sup>43</sup>.

Diversos compuestos de propóleos han sido descritos como potentes inhibidores de estrés oxidativo. Se sabe que la composición del propóleo es variable, sin embargo, uno de sus principales componentes, el éster fenetílico del ácido cafeico, bloquea la producción de radicales libres<sup>43</sup>.

Estudios realizados, in vivo, en animales y humanos demuestran la capacidad antioxidante del propóleo a través de una disminución de la peroxidación lipídica, la cual se encuentra fuertemente asociada con el riesgo de enfermedad cardiovascular<sup>43</sup>.

### **3.10. Actividad fungicida del propóleo**

Según estudios realizados, el propóleo ha demostrado actividad inhibitoria sobre hongos como *Candida albicans* (ATCC14055), *Cryptococcus neoformans*, y *Aspergillus fumigatus*<sup>44</sup>. Esto se debe a la presencia de flavonoides que son metabolitos secundarios los cuales son los ingredientes más abundantes del propóleo y han sido reportados como los responsables de su efecto biológico y actividades farmacológicas.

En otro estudio realizado por Wagh VD (2013). Demostró que en 40 cepas de levaduras de *Candidas spp*, el propóleo utilizado inhibió su crecimiento y que la cepa más sensible fue la *Rhodotorula spp* y la más resistente fue la *Cándida albicans*<sup>45</sup>.

### **3.11. Actividad antibacteriana del propóleo**

Los extractos etanólicos de propóleo tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y una menor actividad contra Gram-negativas y buena actividad contra las levaduras<sup>41</sup>. Se ha sugerido que la actividad antimicrobiana del propóleo depende del sinergismo entre algunos flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos en los propóleos<sup>46</sup>.

El modo de la actividad antimicrobiana de los compuestos de los propóleos no está claro, pero las explicaciones posibles son: inhibición de la motilidad bacteriana, afecto del potencial de la membrana, inhibición de la RNA-polimerasa, desorganización del citoplasma, pared celular y de la célula, e inhibición de la síntesis de la proteína<sup>47</sup>. El uso de los flavonoides contra infecciones bacterianas o fúngicas tiene como objetivos matar las células de los microorganismos o dificultar los efectos de difusión de las toxinas bacterianas<sup>48</sup>.

### **3.12. El propóleo como anticariogénico**

Es de importancia conocer las propiedades del propóleo, ya que las mismas pueden beneficiar de manera significativa a la salud bucodental y en el tratamiento de un problema de salud pública alarmante, como lo es la caries dental.

La actividad antimicrobiana atribuida al propóleo frente al *Enterococcus sp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* es de especial importancia en la práctica clínica odontológica por su potencial efecto anticariogénico<sup>49,50</sup>.

Algunos autores<sup>10,11,51</sup> han sugerido que esta sustancia natural inhibe la actividad enzimática de varias proteínas que son necesarias para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos orales responsables del desarrollo de la caries dental como *Streptococcus mutans* y en menor grado *Lactobacillus acidophilus*.



## 4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Según el reporte del Ministerio de Salud del 2013 la prevalencia de caries en Perú es de un 90.4% de un total de 7730 escolares de zonas urbanas y rurales, además se menciona que según el tipo de caries dental se encontró, 60.5% en piezas temporales y 60.6% en piezas permanentes y la edad del paciente entre 8 a 15 años la presencia de caries vario entre 87.2% a 91.4%, siendo estos valores muy altos en Latinoamérica<sup>14</sup>.

Varios antecedentes mencionan que la actividad antibacteriana del propóleo inhibe el crecimiento de diferentes bacterias bucales tales como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, otros estreptococos y *Actinomyces naeslundii*,<sup>52</sup> debido a que se inhibe la actividad de las glucosiltransferasas y el crecimiento de especies bacterianas en las cuales se incluyen los *Streptococcus* del grupo *mutans*<sup>53</sup>. En el estudio actual de investigación del Dr. Pablo Millones 2018, encontró que la fracción metanólica del propóleo tiene actividad contra biofilms in vitro de *Streptococcus gordonii* ATCC 51656<sup>TM</sup> y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953<sup>TM</sup>, por lo que el presente estudio se propuso estudiar la fracción metanólica frente a los diferentes genotipos de *S. mutans* de niños entre 6 a 12 años de edad con problemas de caries, para determinar la actividad bactericida<sup>17</sup>.

Esto beneficiaría a la salud odontología ya que podría utilizarse como una alternativa natural y así disminuir la caries dental en niños menores de 12 años, disminuyendo de este modo el uso de soluciones químicas como la clorhexidina 0.12% y la resistencia microbiana, debido a que los microorganismos sufren

cambios al verse expuestos a los antibióticos volviéndose ineficaces y persistiendo las infecciones en los pacientes<sup>54</sup>.

## **5. HIPOTESIS**

### **5.1. Hipótesis Nula**

La fracción metanólica del propóleo de Oxapampa no ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los diferentes genotipos de *Streptococcus mutans* aislados de pacientes con caries y problemas de placa blanda dental.

### **5.2. Hipótesis alternativa**

La fracción metanólica del propóleo de Oxapampa ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los diferentes genotipos de *Streptococcus mutans* aislados de pacientes con caries y problemas de placa blanda dental.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1. Objetivo General

Evaluar el efecto inhibitorio de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa en diferentes genotipos aislados de *Streptococcus mutans* de niños con problemas de caries

### 6.2. Objetivo Especifico

- Aislar e identificar *Streptococcus mutans* de niños con problemas de caries de la Clínica Dental Docente Cayetano Heredia.
- Genotipificar con primers específicos tanto para la especie *Streptococcus mutans* como para los diferentes genotipos de *Streptococcus mutans* aislados de niños con problemas de caries de la Escuela Docente de Estomatología.
- Determinar la susceptibilidad de *Streptococcus mutans* aislados de niños con problemas de caries frente a la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa por el método de difusión en disco.
- Comparar los resultados de inhibición entre la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa y clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y las muestras aisladas de niños con problemas de caries.

## 7. VARIABLES DE ESTUDIO

### 7.1. Variable dependiente

Susceptibilidad del *Streptococcus mutans*, frente a la fracción metanólica del propóleo, el cual es expresado en milímetros.

Variable	Definición	Dimensión	Naturaleza de la variable	Escala de medición	Indicador
<b>Fracción metanólica del propóleo de Oxapampa</b>	Sustancia resinosa y pegajosa natural recolectada y elaborada por las abejas	A una concentración de 0.78 mg/ml	Cuantitativa	Ordinal	Concentración de la fracción metanólica del propóleo a 0.78 mg/ml

### 7.2. Variable independiente

El poder de inhibición de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa de una concentración a 0.78 mg/ml

Variable	Definición	Dimensión	Naturaleza de la variable	Escala de medición	Indicador
<b>actividad antibacteriana</b>	Capacidad de una sustancia de inhibir el desarrollo y crecimiento de los diferentes serotipo de <i>S. mutans</i>	Actividad antibacteriana sobre los diferentes serotipos de la bacteria	Cuantitativa	Ordinal	Halos de inhibición del crecimiento bacteriano medido en "mm" de diámetro de la fracción metanólica del propóleo

### 7.3. Variables de Control

- Control positivo: Clorhexidina 0.12% (comercial)
- Control Negativo: DMSO y agua Milli-Q (1:1)

## **8. MATERIALES Y METODOLOGÍA**

### **8.1. Diseño de estudio**

El presente estudio es de tipo experimental secuencial, in vitro, analítico, longitudinal, comparativo y con grupo control.

### **8.2. Muestra**

Las muestras fueron recolectadas en la clínica dental docente Cayetano Heredia durante el mes de agosto 2018 bajo la supervisión y diagnóstico de la odontopediatra Dra. Carmen Kanashiro.

150 niños diagnosticados con caries (con al menos un diente cariado) entre 6 a 12 años, fueron hisopados la mucosa del carrillo, además con un palillo dental se realizó un raspado de placa de los dientes que tenían caries, y luego fueron colocados en un tubo conteniendo 3 ml del medio thioglicolato (Merck 108190), para ser transportado al laboratorio de bacteriología del LID-UPCH.

### **8.3. Criterios de Inclusión**

Niños de 6 a 12 años de edad de ambos sexos que por primera vez asistían a un diagnóstico con problemas de caries y que cuenten con el Asentimiento informado, firmado por los padres y/o apoderados (Anexo 3).

#### **8.4. Criterios de Exclusión**

Niños mayores o igual a 13 años a más de ambos sexos diagnosticados con problemas de caries.

#### **8.5. Determinación del número de muestra**

Para obtener el tamaño de muestra, se utilizó el programa Epidat versión 3.1 usando el módulo cálculos de tamaños de muestra, intervalos de confianza y proporción.

Tamaño de la población: 250 (pacientes atendidos en la clínica estomatológica)

Proporción esperada: 70%

Nivel de confianza: 95.0%

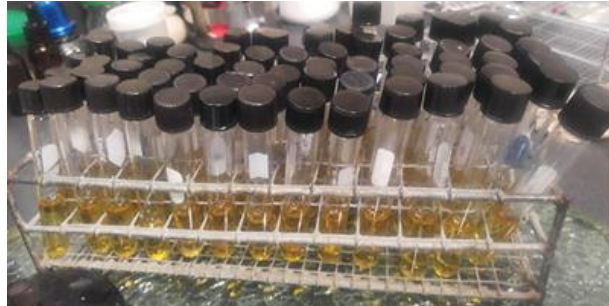
Efecto de diseño: 1.0

<b>Precisión (%)</b>	<b>Tamaño de la muestra</b>
5.000	150

#### **8.6. Toma de muestra**

Se usó caldo thioglicolato (MERCK - 108190) como medio de transporte el cual fue colocado en tubos de 16 x 100 en un volumen de 3 mililitros. Este medio permite el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas y estrictas, debido a sustancias reductoras tales como el thioglicolato de sodio y la cisteína, los cuales disminuyen el potencial de oxidación además el grupo -SH- de estos compuestos neutralizan los efectos bacteriostáticos de los derivados de mercurio, arsénico y otros metales pesados que puedan estar en la muestra de estudio. Otro

punto importante es que el bajo contenido de agar presente en el thioglicolato le otorga la propiedad de ser un medio fluido y retarda la dispersión de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>.



**Figura 1:** Tubos de 16x100 los cuales contenían thioglicolato en un volumen de 3 ml.

Para la recolección de la muestra se usó palillos e hisopos dentales estériles, el palillo de dientes se pasó entre los dientes cariados y el hisopo se pasó por la mucosa del carrillo de los niños con problemas de caries que asistían a la Clínica Dental Docente Cayetano Heredia, los cuales previamente pasaron un estudio clínico preventivo para la determinación de caries.

Cabe resaltar que todo el procedimiento se hizo con el consentimiento del padre de familia o tutor del menor de edad los cuales firmaron el consentimiento informado y en presencia del médico odontólogo.



**Figura 2:** Toma de muestra usando palillos dentales e hisopos estériles en presencia del odontólogo tratante.



Una vez obtenidas las 150 muestras, estas se colocaron en el interior de cada uno de los tubos que contenían el thioglicolato los cuales fueron llevados nuevamente en menos de 3 horas al laboratorio de bacteriología perteneciente al LID (Laboratorio de Investigación y Desarrollo) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, y se las puso en incubación a 37°C por 48 horas.

## **8.7. Aislamiento e Identificación bioquímica de *Streptococcus mutans***

### **8.7.1. Medio de cultivo:**

Siguiendo el método de Hirasawa M, 2003. Se utilizó el Agar Mitis Salivarius (AMS)<sup>55</sup> de la marca Merck 01337, la preparación se realizó de acuerdo al fabricante. Se pesó 90 gramos de AMS en un litro de agua destilada enriquecido con sacarosa al 10%, el cual se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, posteriormente se agregó 1 ml de bacitracina (Sigma B0125) en una concentración de 200U/ul además, de 1 ml de telurito de potasio al 1%. Con la finalidad de hacer que el medio sea mucho más selectivo.

**Tabla 3:** Fórmula para la preparación para un litro de Agar mitis salivarius

<b>Fórmula para la preparación de 1 litro de medio de cultivo</b>	
<b>Composición del AMS</b>	<b>Peso (g)</b>
<b>Triptona</b>	10
<b>Proteasa-peptona n°3</b>	5
<b>Glucosa</b>	1
<b>Sacarosa</b>	50
<b>Fosfato dipotásico</b>	4
<b>Azul tripán</b>	0.075
<b>Cristal violeta</b>	0.0008
<b>Agar</b>	15
<b>Soluciones</b>	<b>Volumen (ul)</b>
<b>Bacitracina 200U/ul</b>	1000
<b>Telurito de potasio 1%</b>	1000

Enriquecido	Peso (g)
Sacarosa 10%	10

Una vez obtenida la formulación de agar mitis salivarius + bacitracina + telurito + sacarosa 10%, se lo distribuyó en placas petri las cuales pasaron por un testeó en la estufa a 37°C por 24 horas, con la finalidad de comprobar su esterilidad para su almacenamiento y posterior uso.



**Figura 3:** Agar Mitis Salivarius + Bacitracina + telurito + sacarosa 10% en placa petri

### 8.7.2. Siembra de las muestras

Pasado las 48 horas y al ver crecimiento en forma de gránulos en el medio de thioglicolato se procedió a sembrar, con la ayuda de una micropipeta 1 ml de la muestra en el Agar Mitis Salivarius enriquecido (Bacitracina + Telurito + Sacarosa 10%), para luego ser extendida por toda la placa con la ayuda del asa Driglaski. Siguiendo las indicaciones de Hamada et al. 1980, se incubó a 37°C por 48 horas en un ambiente de anaerobiosis generado con un sobre de la marca OXOID, dentro de una jarra de anaerobiosis con su respectivo indicador.

Además, fue sembrado en Agar Cerebro Corazón (BHA Merck 70138) para determinar la reacción de oxidasa y catalasa, las cuales deben ser negativas para *S. mutans*.



**Figurs 4:** Placas de Agar Mitis Salivarius incubadas a 37°C por 48 horas en jarras de anaerobiosis con bolsas de anaerobiosis y con su respectivo indicador

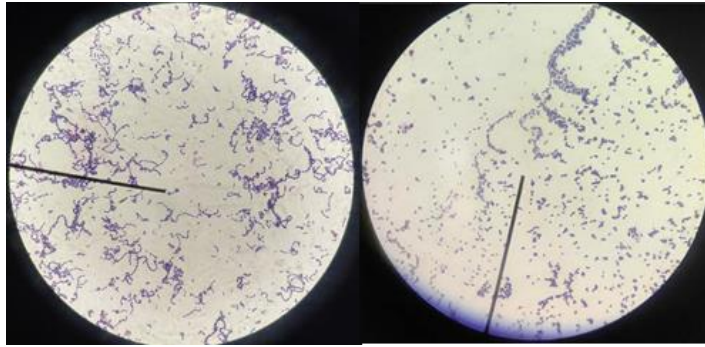
### 8.7.3. Coloración Gram de colonias con características de *Streptococcus* del grupo mutans

Después de las 48 horas, aquellas colonias azules y de consistencia lisa, sospechosas de *Streptococcus mutans*, se le realizó la coloración Gram definida por Beveridge TJ. 2001.



**Figura 5:** Coloración Gram de todas las placas previamente sembrada en anaerobiosis total.

Luego se observaron las láminas teñidas al microscopio óptico y se consideraron como *Streptococcus* del grupo *mutans* aquellas con las características de ser Gram positivas con forma cocácea y agrupadas en cadenas descritas por Aricapa, D<sup>25</sup>.



**Figura 6:** Bacterias del grupo Mutans son Gram positivas con forma cocácea y agrupadas en cadenas

## **8.8. Identificación bioquímica de los *Streptococcus* del grupo *mutans*.**

### **8.8.1. Preparación de los caldos de fermentación para carbohidratos manitol, sorbitol y rafinosa.**

Para este procedimiento se preparó por separado tres tubos que contenían 20 ml de agua destilada estéril, al cual se le agregó 2 gramos de manitol, sorbitol y rafinosa respectivamente, todo el procedimiento se realizó cerca de un mechero para evitar contaminación y se reservaron para su posterior uso. (anexo 1)

Además, se preparó por separado tres frascos conteniendo 90 ml de caldo nutritivo, que luego fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos.

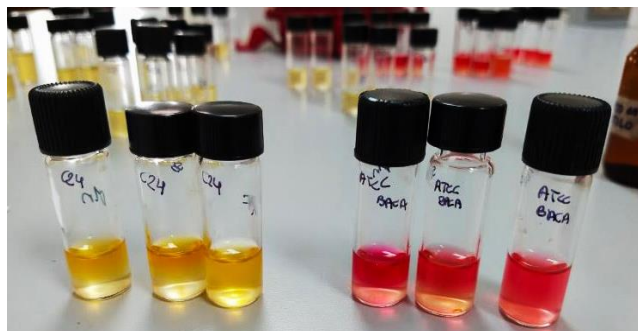
A uno de los frascos que contenía 90ml se le agregó 10 ml de manitol filtrado a través de una jeringa simple pure PES 0.22 µml, el mismo procedimiento se realizó para el sorbitol y la rafinosa<sup>57</sup>.



**Figura 7:** Filtrado de los 10 ml en el recipiente que contiene los 90 ml de caldo nutritivo.

Entonces cada uno de los caldos, fue repartido en tubos de 4 ml con un volumen de 1 ml: 150 tubos conteniendo manitol, 150 tubos conteniendo sorbitol y 150 tubos conteniendo rafinosa. Los viales de manitol, sorbitol y rafinosa se separaron en grupos de tres y a cada grupo se le agrego una gota de las 150 cepas aisladas y se incubo a 37°C por 48 horas en microaerofilia<sup>57</sup>.

Transcurrida las 48 horas, se agregó a cada uno de los cultivos una gota del indicador rojo de metilo, para visualizar si la bacteria había fermento los carbohidratos. Cuando el tubo se torna de color rojo es fermentación positiva y una fermentación negativa es cuando permanece de color del medio o amarillo (Figura 8)



**Figura 8:** viales con 1 ml de manitol, sorbitol y rafinosa a los cuales se le agregó rojo de metilo, viales del lado izquierdo: cepa aislada, no fermenta los tres carbohidratos, viales del lado derecho: cepa ATCC 25175, si fermentan los tres carbohidratos.

### **8.8.2. Mantenimiento de las cepas caracterizadas bioquímicamente.**

Las cepas que resultaron positivas para la fermentación de los carbohidratos, catalasa, oxidasa y Gram, fueron resembradas en el medio BHA para su identificación genotípica por PCR convencional y su vez se resembró en caldo BHI para mantenerlas hasta su enfrentamiento con la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa.

### **8.9. Determinación de los genotipos por PCR convencional.**

La determinación de los diferentes serotipos por PCR, se realizó en el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Para comprobar si las muestras que pasaron las pruebas bioquímicas son de la especie de *Streptococcus mutans* se realizó el PCR convencional usando los primers Smut (SMUT5: TGA AAC CTT GTC TAT CTC CTC TTT ACC y SMUT3: TCA GTT TTC AAA GGG CTC TG) con unos 137 pb<sup>58</sup> y para la identificación de los genotipos se utilizaron los primers C, E, F y K. Para el genotipo c se utilizó los primers SC-F CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG y SC-R AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTT TAT con fragmentos de 727 pb<sup>33</sup>, genotipo e los primers SE-F CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC y SE-R CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA con fragmentos de 517 pb<sup>33</sup>, genotipo f los primers SF-F CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA y SF-R TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG con fragmentos de 316 pb<sup>33</sup> y por último el genotipo k con los primers CEFK-F ATT CCC GCC GTT GGA CCA TTC C y k-R CCA ATG TGA TTC ATC CCA TAC

C con fragmentos de 294 pb<sup>59</sup>. Se utilizó una cepa estándar de *S. mutans* genotipo C.

Se utilizó el GenElute Bacterial Genomic DNA Kit, para la extracción del ADN de las bacterias previamente cultivadas en placas Petri en medio BHA cultivados a 48 horas a 37°C en microaerofilia. Para realizar esta extracción, se realizó un barrido de la siembra y se colocó en tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y resuspendido con 1 ml de buffer TE, este procedimiento se realizó a cada una de las cepas. Luego se agregó 20µL de lisozima y fue incubado en un baño maría con agitación por 40 minutos a 37°C. Para la lisis de las células, se le agregó 20µL de proteinasa K (20mg/mL) seguido de 200 µl de solución de lisis C, se mezcló mediante un vortex por 15 segundos y se dejó incubar por 15 minutos a 55°C.

Mientras se esperaba la incubación se realizó la preparación de las columnas, incluidas en el Kit, que se colocaron dentro de un tubo recolector de 2 ml, a los cuales se le añadió 500 µL de solución de preparación de columna, y se centrifugo a 12.000 X g por 1 minuto, terminado el tiempo se decantó el contenido del tubo recolector.

Terminado la incubación de la lisis de las células, se le agregó 200 µL de etanol al 100% y se mezcló mediante vortex por 10 segundos. Luego con la ayuda de una micro pipeta de 1000 µL, se transfirió el contenido a la columna y se centrifugo a 12.000 X g durante 1 minuto, finalizado el tiempo se decantó el tubo recolector.

Se realiza el primer lavado añadiendo 500 µl de solución de lavado 1 a la columna y se centrifugo durante 1 minuto a 10.000 X g, al finalizar se decantó el contenido. Para el segundo lavado se agregó 500 µL de solución de lavado a la columna y se

centrifugo por 6 minutos a 16.000 X g con la finalidad de secar la columna. Finalmente, se desecha el tubo de recolección que contiene el eluido y se coloca la columna en un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL.

Para finalizar, con la ayuda de una micropipeta se agregó 20 µL de la solución de elución a la columna y se centrifugo durante 1 minuto a 6500 X g para eluir el ADN. Para aumentar la eficiencia de elución, se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente

Para realizar la verificación de la integridad de los ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer Tris-acetate-EDTA (TAE 1X). Se conectó a una fuente de poder eléctrica y se realizó la corrida electroforética a 94V durante 45 minutos, finalmente se sumergió el gel en una bandeja conteniendo agua destilada y 20 µL de bromuro de etidio por unos 20 minutos, luego se colocó en una bandeja conteniendo agua destilada y finalmente se visualizaron las bandas en un transluminador de UV para visualizar las bandas y determinar el peso molecular por comparación de los patrones.

Se cuantificó la concentración y la pureza de ADN empleando un espectrofotómetro UV visible de espectro completo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Luego se aplicaron primers SMUT<sup>33</sup> específicos para confirmar que se trataban de *S. mutans* de manera seguida se usaron los primers c, e, f y k para determinar la genotipificación de las cepas.

El ADN extraído de las cepas para determinar la especie *S. mutans* con los primers SMUT se colocaron en el Thermocycle realizando 25 ciclos: Desnaturalización:



96°C - 15 s, hibridación: 61°C - 30 s y Extensión: 72°C - 1 m. Se le agrego Sample buffer 1 ul (purple loading dye)<sup>58</sup> (Anexo 2)



**Figura 9:** Primers SMUT'5 y SMUT'3 colocadas en el Thermocycle

Para la genotipificación de las cepas se usaron los primers C, E, F que fueron colocados en el Thermociclador con un total de 25 ciclos: Desnaturalización: 96°C - 15 s, hibridación: 61°C - 30 s y Extensión: 72°C - 1 m. Mientras que para el genotipo K fue de, 25 ciclos: Desnaturalización: 95°C - 30 s, hibridación: 60°C - 30 s y Extensión: 72°C – 30 s<sup>59</sup>



**Figura 10:** Mix de primers de los serotipos (C,F,E) en el Thermocycle del lado izquierdo, primers del serotipo K en el Thermocycle del lado derecho

Las cepas fueron colocadas en un gel de agarosa al 1% con buffer Tris-acetate-EDTA (TAE 1X) para realizarle una corrida electroforética a 94V durante 1 hora, el gel fue colocado en un baño de agua conteniendo 20 µL de bromuro de etidio por 20 minutos, finalmente, para la visualización de las bandas se utilizó el

transluminador UV (modelo High Performance UV Transilluminator TFM-40V), para luego realizar la comparación con los marcadores de pares de bases, 1 kb Plus DNA Ladder para los primers SMUT y 100 kb Plus DNA Ladder para los primers C, E, F y K.

#### **8.10. Fracción metanólica del propóleo**

40 mL de fracción metanólica del propóleo de una concentración de 0.78 mg/ml, fue proporcionado por el Laboratorio de Bacteriología de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Facultad de Ciencias y Filosofía. La fracción fue obtenida durante el desarrollo de la tesis del actual doctor Pablo Millones Gómez titulada “Efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de *streptococcus gordonii* y *fusobacterium nucleatum*<sup>17</sup> “

Esta fracción metanólica es parte del Extracto Bruto Orgánico obtenido a partir del propóleo de Oxapampa (departamento Cerro de Pasco – Perú, ubicación geográfica 10°39’01.6”S 75°23’14.7”W) el cual fue tratado por la metodología química líquido-líquido<sup>17</sup>.

Esto se obtuvo macerando el propóleo en etanol grado P.A para obtener el Extracto Bruto Orgánico (E.B.O), luego fue solubilizado con una mezcla de cloroformo- metanol 4:1 v/v para conseguir solubilizar completamente la muestra, seguidamente para obtener la partición líquido – líquido se utilizaron una columna de vidrio con llave de teflon que contenía agua ultrapura, propóleo solubilizado y cloroformo (CHCl<sub>3</sub>) que luego formo dos fases, la fase superior es la acuosa la fase inferior es la fase orgánica clorofórmica, y después de seis horas de reposo

se extrajo la fase inferior de la columna (fase orgánica clorofórmica) y la fase superior (La fase acuosa) las cuales se sometieron a una cámara extractora para extraer el cloroformo<sup>60,61</sup>

En la misma columna, se agregaron la fase acuosa y 1-butanol (BuOH) en donde observaron la formación de dos fases, inferior acuosa y superior butanólica, dejándolas en reposo por 3 horas para luego ser separadas y sometidas a una cámara extractora para la evaporación del BuOH. La fase acuosa fue congelada por 24 horas y liofilizada obteniendo 3 residuos: residuo clorofórmico (RCHCl<sub>3</sub>), residuo butanólico (R<sub>Bu</sub>OH) y residuo acuoso (RH<sub>2</sub>O)<sup>62,63</sup>.

A partir del residuo clorofórmico (RCHCl<sub>3</sub>), realizaron el fraccionamiento metanólico utilizando como fase estacionaria Sephadex LH-20 y como fase móvil los solventes: eter de petróleo (EP), diclorometano (DCM) y metanol (MeOH), de esta manera obtuvieron 3 fracciones: la fracción de éter de petróleo (FEP), fracción de diclorometano (FDCM) y la fracción metanólica (FMeOH). Las fracciones que obtuvieron fueron secadas en una campana de extracción<sup>63,64</sup>.

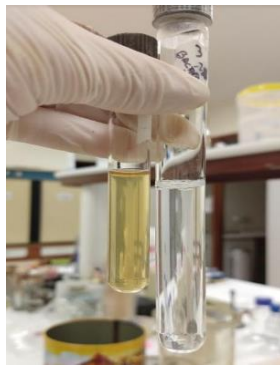
La obtención de esta fracción metanólica (FMeOH), es la utilizada para el desarrollo de la presente tesis.

### **8.11. Evaluación del efecto inhibitorio del residuo metanólico del propóleo de Oxapampa sobre las diferentes cepas aisladas de *Streptococcus mutans***

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

El medio de cultivo se preparó en placas conteniendo agar infusión cerebro corazón. (BHA) para *S. mutans* ATCC® 25175™ y para las cepas aisladas positivas para *S. mutans* con su respectiva genotipificación, las cuales fueron controladas por 24 horas para comprobar la esterilidad<sup>17</sup>.

Para la preparación del inóculo, las bacterias fueron cultivadas en caldo de Infusión Cerebro Corazón en condiciones de microaerofilia a 37°C por 24 horas y luego se llevó a la escala de Mac Farland de 0,5.



**Figura 11:** Inoculo a la escala de Mac Farland de 0,5

El enfrentamiento se realizó embebiendo un hisopo estéril con el inóculo previamente preparado, para luego proceder a sembrar en la superficie del agar por cuatro veces en toda la superficie del agar, dejando reposar por unos 5 minutos, luego se colocó tres discos de papel de filtro (Whatman 3) de 6 mm de diámetro, usando como control positivo 10 µL clorhexidina a 0.12%, control negativo 10 µL DMSO y agua Milli-Q (1:1) y 10 µL de la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa de una concentración de 0.78 mg/ml, los cuales se llevaron a incubación a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia.



**Figura 12:** Placas sembradas y con sus respectivos discos de papel filtro en microaerofilia

Por último, se hizo la lectura de resultados a través de los halos de inhibición en milímetros (mm) con la ayuda de un vernier calibrado marca Truper.

### **8.12. Consideraciones éticas**

La presente investigación fue registrada y aprobada por el comité de ética institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con la constancia N°324-12-18 cuya aprobación incluyó asentimiento informado (menores de 12 años) y consentimiento informado (padres). (Anexos 3, 4 y 5)

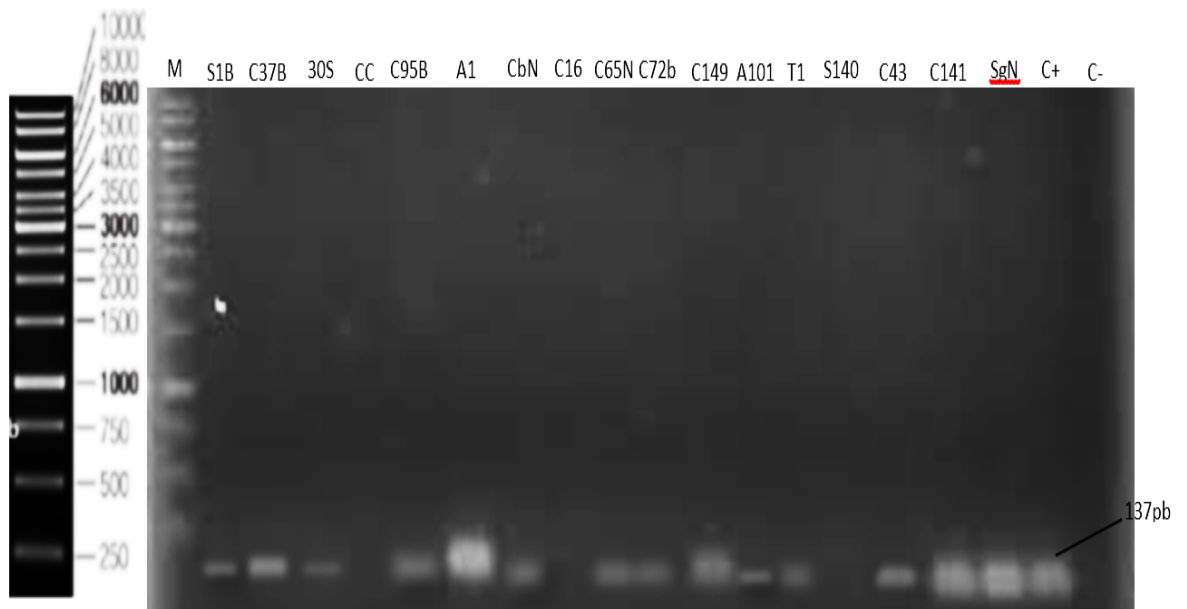
### **8.13. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos (anexo 6) en la prueba de PCR convencional fueron analizados mediante estadística descriptiva y los datos obtenidos en las pruebas de halo de inhibición fueron presentados en promedios, desviaciones estándar y medianas y se realizaron la prueba de T Student para comparar los grupos estudiados con un IC = 95% y un  $\alpha = 0.05$

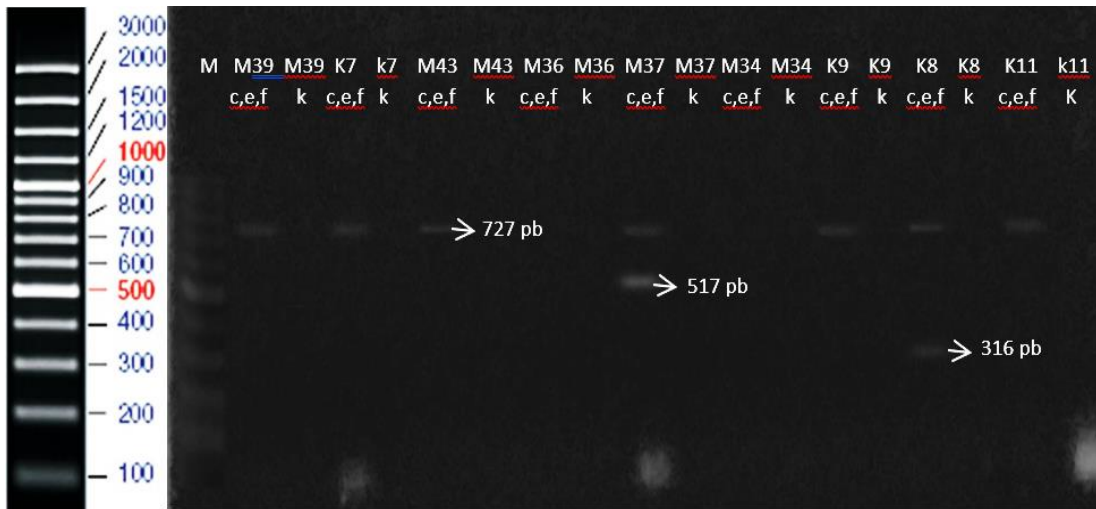
## 9. RESULTADOS

De las 150 muestras recolectadas de los niños diagnosticados con caries, se identificaron 142 con características morfológicas y bioquímicas positivas para *Streptococcus mutans*

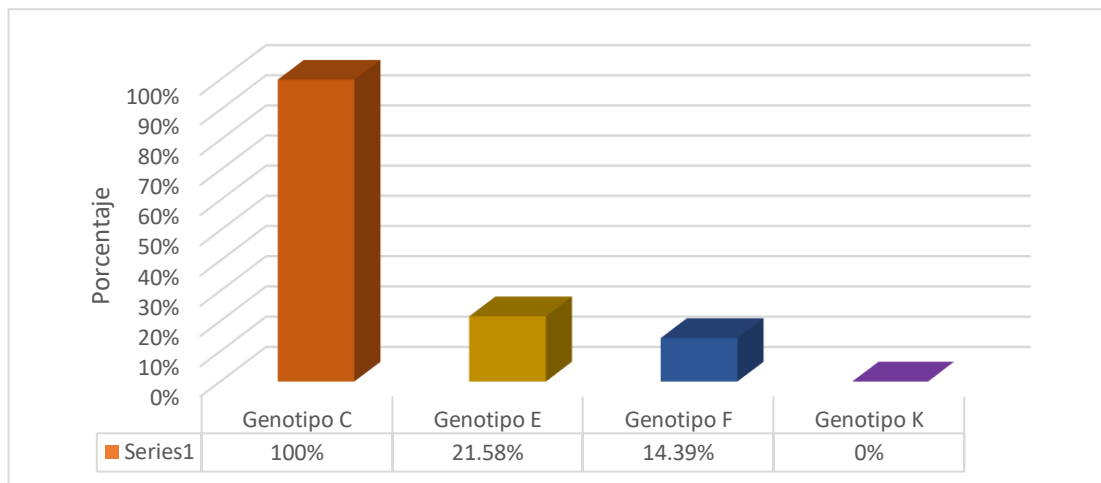
De las 142 cepas que salieron positivas con las pruebas bioquímicas convencionales, solo 138 resultaron ser de la especie *Streptococcus mutans* al identificarlas con el primer específico SMUT. Después de realizar la genotipificación a estas cepas, resultaron que el 100% pertenecía al genotipo c, seguido por el genotipo e (21.58%) y por último el genotipo f (14.39%), mientras que no se encontró el genotipo k. También se encontraron muestras que presentaban más de un genotipo (genotipos múltiples) como, los genotipos c, e en 21.73% y los genotipos c, f en 14.49%



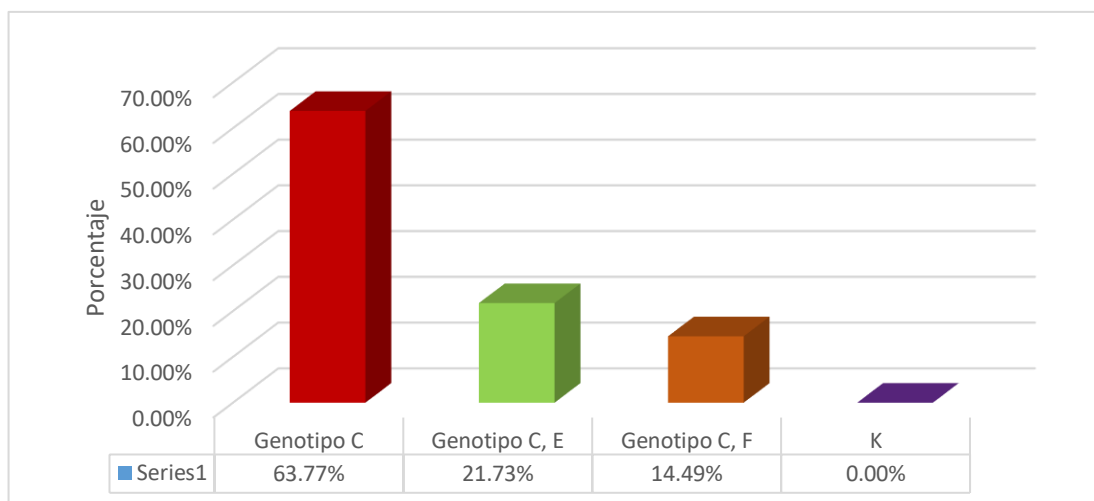
**Figura 13:** Electroforesis en agarosa 1% de los productos de amplificación con los primers Smut. Fragmento de 137 pb.



**Figura 14:** Electroforesis en agarosa 1% de los productos de amplificación con los primers cef y k. Fragmento de 727 pb genotipo c, 517 pb genotipo e y 316 pb genotipo f.



**Figura 15:** Porcentaje de genotipos de *Streptococcus mutans* de niños con problemas de caries en donde se tiene que el genotipo c es 100%, el genotipo e es 21.58%, el genotipo f es 14.39% y el genotipo k es 0%



**Figura 16:** Porcentaje de genotipos múltiples en donde se tiene que los genotipos c, e es 21.73% y el genotipo c, f es 14.49% y los genotipos individual c es de un 63.77%, mientras que k fue de un 0%

La tabla 4 se muestra los resultados de la susceptibilidad de *Streptococcus mutans* frente a la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa y clorhexidina según los halos de inhibición, podemos observar que la fracción metanólica del propóleo de Oxapampa responde de manera similar sin diferencia significativa frente a la clorhexidina al 0.12%  $p = 0.85$ .

También se observó que la respuesta del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y las muestras de los niños diagnosticados con caries, tienen diferencias significativas tanto para clorhexidina al 0.12% como para la fracción metanólica del propóleo  $p = 0.005$

Los diámetros de los halos de inhibición de la fracción metabólica del propóleo (9 a 24mm) enfrentados a *S. mutans* mostraron mayor diámetro en relación a los enfrentados con la cepa ATCC 25175 (10 a 10.5 mm)



**Tabla 4:** Comparación del promedio, desviación estándar y mediana de los halos de inhibición de *Streptococcus mutans* ATCC y muestras de pacientes de niños con problemas de caries.

	DMSO + agua milli q			Clorhexidina			Fracción metanólica			p
	promedio	desviación estándar	mediana	promedio	desviación estándar	mediana	promedio	desviación estándar	mediana	
ATCC	0	0	0	14.83	0.28	15	10.16	0.28	10	
Muestras	0	0	0	16.83	5.35	15.5	14.13	5.27	11.5	0.85
P					0.005			0.005		

p: prueba T student con IC = 95%

Prueba T student, p = <0.05 es significativo

## 10.DISCUSIÓN

La caries es una de las enfermedades de naturaleza infecciosa crónica transmisible, muy prevalente en el Perú y el mundo, varios son los estudios que relacionan a las caries dentales con la presencia de *Streptococcus mutans*<sup>14</sup>. Además, se viene realizando estudios sobre el principio activo de diferentes plantas para determinar su efecto inhibitorio, pero pocos son los trabajos de prevalencia y genotipos circulantes de *S. mutans* en niños diagnosticados con caries. En el presente estudio de 150 niños diagnosticados con caries se encontró que 138 pertenecen a esta especie, siendo el más prevalente el genotipo c, seguido por el e y f, no detectándose la presencia del genotipo k, difiriendo del estudio de Momeni, et al, quienes en un estudio de 129 pacientes los genotipos más prevalentes fueron c y k, seguido por e y f.

La presencia de la especie *S. mutans* empleando PCR convencional, tuvo una prevalencia de un 92% en saliva y sarro, la cual fue mayor que la encontrada por Delgadillo J, et al, quienes evidenciaron un 75,6% en saliva (Perú)<sup>65</sup>, Sánchez & Acosta con un 32% en placa dentobacteriana de la fisura (México)<sup>66</sup> y Arévalo et al. encontraron 14,9% en saliva (Colombia)<sup>67</sup>. Hay que considerar que la diferencia de los porcentajes podría estar limitado por las diferentes técnicas empleadas para el muestreo, aislamiento e identificación, así como también a la alimentación, consumo de antibióticos, lesión cariosa y la clasificación de los diferentes tipos de caries presentes en los niños.

Los diferentes genotipos *de S. mutans* encontrados a nivel mundial pertenecen al genotipo c<sup>34,68,69</sup> con 70% - 80%, el genotipo e en un 20% y el genotipo f en un 10%<sup>70</sup>, estos resultados concuerdan con el presente estudio, donde se observa que el genotipo c se encuentra presente en un 100%, genotipo e en un 20.58% y el genotipo f en un 14.39%. Mientras que el serotipo k, tiene una frecuencia menor de 5%<sup>34</sup>, no encontrándose en este estudio.

El serotipo K está definido por tener una menor susceptibilidad a la fagocitosis y una alta capacidad de invasión del endotelio humano, lo que sugiere que podría considerarse un factor de riesgo para el desarrollo de endocarditis infecciosa, también se menciona que puede estar relacionado con niños con síndrome de Down, por sus posibles desórdenes en las funciones de los leucocitos polimorfonucleados<sup>71</sup>. En este estudio no se encontró la presencia de *Streptococcus mutans* genotipo K, difiriendo con el estudio realizado en Estados Unidos en donde la prevalencia general del genotipo k sigue siendo la segunda más alta informada con un 35,2 %<sup>72</sup>.

Los hallazgos de *Streptococcus mutans* de pacientes con caries en diferentes estudios se ha observado que un individuo puede compartir hasta más de dos genotipos, a los cuales se les ha denominada genotipos múltiples. En el presente estudio se ha encontrado genotipos múltiples (36,23%) de los cuales c, e es 21.73% y C, F es 14.49%. Momeni en su estudio encontró un 59.7%, de una población de 77/129 de niños con genotipos múltiples, siendo los más frecuentes el C, K con un 31%, seguido de los c,e,k con un 11.3% y c, e con un 7.75%<sup>70</sup>, como se puede

observar en el presente trabajo que coincide con la presencia de los serotipos múltiples a pesar de no coincidir en la misma combinación.

Los resultados de la medida de los halos de inhibición de la fracción metabólica del propóleo (9 a 24mm) enfrentados a *S. mutans* mostraron mayor diámetro en relación a los enfrentados con la cepa ATCC 25175 (10 a 10.5 mm), esto podría deberse a las características de la fracción metabólica ya que Galgowski C, *et al* manifiestan que la fracción metabólica podría contener una mayor cantidad de compuestos bioactivos no polares con una actividad antimicrobiana potencialmente mayor<sup>73</sup>.

Diversos estudios muestran el potencial de los diferentes productos naturales<sup>17,74</sup>, con cepas estándares ATCC, sin embargo, este sería el primer estudio que muestra el potencial de la fracción metabólica del propóleo frente a cepas aisladas de pacientes diagnosticados con caries.

## 11. CONCLUSIONES

- De 150 muestras de los niños diagnosticados con caries, solo 138 cepas resultaron positivas para *Streptococcus mutans* utilizando los primers específicos SMUT.
- La genotipificación para *Streptococcus mutans* encontró que el 100% pertenecía al genotipo C, el 21.58% al genotipo E y el 14.39% al genotipo F y no se encontró el genotipo K.
- Se encontró genotipos múltiples en donde los genotipos c, e es 21.73% y el genotipo c, f es 14.49%.
- La fracción metanólica responde de manera similar sin diferencia significativa frente a la clorhexidina al 0.12% con un  $p = 0.85$
- La respuesta del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y las muestras de los niños diagnosticados con caries, tienen diferencias significativas tanto para clorhexidina al 0.12% como para la fracción metanólica del propóleo  $p = 0.005$
- El diámetro de los halos de inhibición de la fracción metabólica del propóleo (9 a 24mm) frente a *S. mutans* mostraron mayor diámetro en relación a los obtenidos con la cepa ATCC 25175 (10 a 10.5 mm). Los cuales respondieron de manera similar sin diferencia significativa frente a la clorhexidina al 0.12%.

## **12. RECOMENDACIONES**

- Repetir el presente estudio considerando a las poblaciones de niños con problemas de caries que se encuentran en las diferentes zonas geográficas del Perú.
- Considerar en futuros estudios el tipo de alimentación, consumo de antibióticos, lesión cariosa y la clasificación de los diferentes tipos de caries presentes en los niños de esta edad (6 a 12 años).
- Probar la fracción metanólica de aquellos propóleos que presenten actividad antibacteriana existentes en el Perú.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. Fuentes F, Sifuentes MC, Nieto C. Promoción y educación para la salud en odontología. 1era. Ed. Ciudad de México: Editorial El Mundo Moderno S.A; 2014.
2. Marchant S, Brailsford S, Twomey A, *et al.* The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res.* 2001 Nov-Dec;35(6):397-406. doi: 10.1159/000047482.
3. Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ, Hughes CV. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J.* 1993 Mar;7(5):406-13. doi: 10.1096/fasebj.7.5.8462782.
4. Rojas Triviño, A Conceptos y práctica de Microbiología general. [Internet] Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 2011 [citado: 2022, julio] Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira Facultad de Ciencias Agropecuarias.
5. Brambilla E, García-Godoy F, Strohmenger L. Principles of diagnosis and treatment of high-caries-risk subjects. *Dent Clin North Am.* 2000 Jul;44(3):507-40, vi. PMID: 10925771.
6. Carletto-Körber F, González-Ittig R, Jimenez MG, Cornejo LS. Diversidad de serotipos de *Streptococcus mutans* y actualidad de caries en niños de Argentina. *ResearchGate.* 2016; 16(3): 177-180.
7. Purca TP. Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Lima:Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.

8. Manrique AJ. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical*, 24(1), 43-53.
9. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharm* [Internet]. 20 de diciembre de 2001 [citado 21 de julio de 2022];43(1-2):187-04. Disponible en: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5681>
10. Bellón S, Calzadilla X. Efectividad del uso del propóleo en el tratamiento de la estomatitis aftosa. *Rev Cubana Estomatol* [Internet]. 2007 Sep [citado 2022 Jul 20] ;44 (3). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072007000300008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072007000300008&lng=es).
11. Carrillo ML, Castillo LN, Rosalba M. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina México, *Información tecnológica*, 2011, 22(5), 21-28.
12. Caviedes-Bucheli J, Meneses JP. Problemática del conducto abierto a la cavidad oral. *Academia Javeriana de Endodoncia*. [acceso 4 de septiembre 2017]. Disponible en: [http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodoncia/i\\_a\\_revision22.html](http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodoncia/i_a_revision22.html).
13. Canalda C. *Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas*. 4th. ed. Carlos Canalda Sahli, Esteban Brau Aguadé; 2001
14. Ministerio de Salud del Perú Oficina general de epidemiología y dirección general de salud de las personas. Prevalencia nacional de caries dental,



fluorosis del esmalte y urgencia de tratamiento en escolares de 6 a 8, 10, 12 y 15 años. Perú, Lima-2005.

15. Pepeljnjak S, Kosalec I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 2004 Nov 1;240(1):111-6.
16. Estrada-Reyes Rosa, Ubaldo-Suárez Denisse, Araujo-Escalona Ana Gabriela. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. Salud Ment [revista en la Internet]. 2012 Oct [citado 2022 Jul 21]; 35(5): 375-384. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33252012000500004&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252012000500004&lng=es).
17. Millones P. Efecto antibacteriano de propóleos peruanos y acción de una fracción metanólica sobre un biofilm in vitro de *streptococcus gordonii* y *fusobacterium nucleatum*. [Tesis para optar el Grado de Doctor en Estomatología]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2021.
18. Red de colaboración sobre la carga mundial de morbilidad. Estudio sobre la carga mundial de la morbilidad 2019. Seattle (Estados Unidos de América): Instituto de Métrica y Evaluación Sanitaria (IHME); 2020. Disponible en: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.
19. Red de colaboración sobre la carga mundial de morbilidad. Estudio sobre la carga mundial de la morbilidad 2019. Seattle (Estados Unidos de América): Instituto de Métrica y Evaluación Sanitaria (IHME); 2020. Disponible en: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-results-tool>.
20. Ojeda-Garcés Juan Carlos, Oviedo-García Eliana, Salas Luis Andrés. Streptococcus mutans y caries dental. CES odontol. [Internet]. enero de 2013

[citado el 20 de julio de 2022]; 26(1): 44-56. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en).

21. Mamani RC. Variación del pH salival antes y después del consumo de la merienda escolar con y sin cepillado dental en niños de 4 y 5 años en el centro infantil San Francisco de Asis en el 1º semestre del 2014 [Tesis para optar el grado de Maestro Especialista en Odontopediatra]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2014.
22. Lasa I. Biofilms bacterianos. Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales y Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra.
23. Nazar C Julio. Biofilms bacterianos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello [Internet]. 2007 Abr [citado el 20 junio 2022]; 67(1): 161-172. Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-48162007000100011&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-48162007000100011&lng=es). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>.
24. Carranza N. Bioquímica del biofilm cariogénico. Cátedra de Bioquímica General y Bucal –FOUBA- 2013.
25. Aricapa D. Aricapa D. Actividad Antimicrobiana De Plantas Sobre Microorganismos Cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana, 2014
26. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. J Dent Res. 2006 Oct;85(10):878-87.

27. Clarke JK. On the Bacterial Factor in the Ætiology of Dental Caries. *Br J Exp Pathol.* 1924 Jun;5(3):141–7. PMID: PMC2047899.
28. Arevalo CM. Efecto antimicrobiano in vitro de tres variedades de própolis frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2014.
29. Nakano K, Nomura R, Nemoto H, Mukai T, Yoshioka H, Shudo Y, et al. Detection of novel serotype k *Streptococcus mutans* in infective endocarditis patients. *J Med Microbiol.* 2007 Oct;56(Pt 10):1413-1415.
30. Hardie JM & Whiley RA. The Genus *Streptococcus*-Oral. *Prokaryotes* 2006; 4:76–107.
31. Chamorro-Jiménez AL, Ospina-Cataño A, Arango-Rincón JC & Martínez-Delgado CM. Acción de la inmunoglobulina A secretora en el proceso de adherencia del *Streptococcus mutans* al diente humano. *CES odontol.* [Internet]. julio de 2013 [citado el 20 de julio de 2022]; 26(2): 76-106. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X2013000200008&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000200008&lng=en).
32. Harper DS, Loesche WJ. Effect of pH upon sucrose and glucose catabolism by the various genogroups of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 1983 May;62(5):526-31. doi: 10.1177/00220345830620050101.
33. Shibata Y, Ozaki K, Seki M, Tanaka H, Nakano Y, Shibata Y, et al. Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. *J Clin Microbiol.* 2003 Sep;41(9):4107-12.

34. Nakano K, Nomura R, Nakagawa I, Hamada S, Ooshima T. Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype, k, in the human oral cavity. J Clin Microbiol. 2004 Jan;42(1):198-202.
35. Li L, Messas E, Batista EL Jr, Levine RA, Amar S. Porphyromonas gingivalis infection accelerates the progression of atherosclerosis in a heterozygous apolipoprotein E-deficient murine model. Circulation. 2002 Feb 19;105(7):861-7.
36. Mills EL, Quie PG. Congenital disorders of the function of polymorphonuclear neutrophils. Rev Infect Dis. 1980 May-Jun;2(3):505-17.
37. Pretel-Tinoco C & Chávez B. Enfermedad periodontal como factor de riesgo de condiciones sistémicas. Rev. Estomatol Herediana. 2013; 23(4):223-9.
38. Agra R, Rodrigues E, Marcucci, M, Ramalho A, Domingues N, Esfrain W. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. Ciência Rural, 36, 2006, p. 1842-1848
39. Chaillou LL. Estudio del Propóleos de Santiago del Estero. Cienc Tecnol Aliment Campinas. 2004; 24(1): 011-5.
40. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. Evid Based Complement Alternat Med. 2013.
41. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Villarreal J & González A. Uso del propóleo en odontología. Acta Odontol Venez. 2010. [acceso 4 de Septiembre 2017]; 48(2). Disponible en: <http://actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art22.asp>

42. Fernández AG. Prodigio de las abejas: El propóleo y la jalea real. Lo Natural y Tradicional [revista en Internet], 2005 [acceso 4 de septiembre 2017]. Disponible en: <http://www.sld.cu/saludvida/naturaltradicional/temas.php?idv=13094>
43. Beltrame J, Saes D. Emerging roles of propolis: antioxidante, acardioprotective and antiangiogénica actions. 2013 sep. 35(3):112-118
44. Londoño-Orozco A, *et al.* Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. Tecnología en Marcha. 2008. 49-55.
45. Wagh VD. Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. Adv Pharmacol Sci. 2013.
46. Santos FA, Bastos EM, Uzeda M, Carvalho MA, Farias LM, Moreira ES, Braga FC. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. J Ethnopharmacol. 2002 Apr;80(1):1-7.
47. Pepeljnjak S, Kosalec I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, Enterococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol Lett. 2004 Nov 1;240(1):111-6.
48. Manrique AJ & Santana WC. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. Zootecnia Trop. 2008, 26(2): 157-166.
49. Núñez DP & García BI. Núñez DP, García BL. Bioquímica de la caries dental. Rev haban cienc méd [Internet]. 2010 Jun [citado 22 Junio 2022]; 9(2): 156-166. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2010000200004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200004&lng=es)

50. Vit P. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: miel, polen y propóleos. INHRR. 35(2): 32-39, 2004.
51. Pimentel E. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. Rev. Estomatol. v. 25, n. 4, 2015.
52. Park YK, Koo MH, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. Curr Microbiol. 1998 Jan;36(1):24
53. Koo, H. *et al.* Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. Caries Res 2000; 34(5): 361-442.
54. Barrientos, S. *et al.* Resistencia a la amoxicilina de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibioticoterapia previa y sin esta. Univ Odontol. 2015 Ene-Jun; 34(72): 101-106.2002; 46(5):1302-1309.
55. Hirasawa M, Takada K. A new selective medium for *Streptococcus mutans* and the distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* and their serotypes in dental plaque. Caries Res. 2003; 37(3):212-217.
56. Beveridge TJ. Use of the gram stain in microbiology. Biotech Histochem. 2001 May;76(3):111-8.
57. Beighton D, Russell A.A.B, Whiley R.A. A simple biochemical scheme for defferentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Caries Res. 1991; 25:174-178.

58. Salazar, L. A.; Vásquez, C.; Almuna, A.; Oporto, G.; Santana, R.; Herrera, C. L. & Sanhueza, A. Detección molecular de estreptococos cariogénicos en saliva. *Int. J. Morphol.* 2008. 26(4):951-958.
59. Nakano K, Nomura R, Shimizu N, *et al*, Development of a PCR Method for Rapid Identification of New *Streptococcus mutans* Serotype k Strains, *Journal Of Clinical Microbiology*, Nov. 2004, p. 4925–4930
60. Verma UP, Gupta A, Yadav RK, Tiwari R, Sharma R, Balapure AK. Cytotoxicity of chlorhexidine and neem extract on cultured human gingival fibroblasts through fluorescence-activated cell sorting analysis: An in-vitro study. *Eur J Dent.* 2018;12(3):344-49.
61. Santos FA, Bastos EM, Uzeda M, *et al*. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol.* 2002;80(1):1-7.
62. Simões LM, Gregório LE, Da Silva Filho AA, *et al*. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol.* 2004;94(1):59-65.
63. Yang H, Dong Y, Du H, Shi H, Peng Y, Li X. Antioxidant compounds from propolis collected in Anhui, China. *Molecules.* 2011;16(4):3444-3455.
64. Mancarz GF, Laba LC, da Silva EC. *Liquidambar styraciflua* L.: A new potential source for therapeutic uses. *J Pharm Biomed Anal.* 2019;174:422- 31.
65. Delgadillo J., Espinoza S., Campodónico C., Evaristo T., Cáceres L., Gómez D., Chacón P., 2018: Presencia de *Streptococcus mutans* Genotipo C en niños y adolescentes peruanos con caries. *ODOVTOS-Int. J. Dent. Sc. | No. 20-3,* 105-113, 2018. ISSN:1659-1046

66. Sánchez-Pérez, L., Acosta G, E. Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en escolares. *Revista ADM* 2007; 54 (2): 45-51.
67. Arévalo, M., Canacuan, F., Echeverry, J., Salazar, C., Martínez, C., Martínez, M., Correa, M. Identificación molecular y genotipificación de *Streptococcus mutans* de muestras de saliva de niños de Medellín, Colombia *CES odontol.* [Internet]. diciembre de 2014 [citado el 12 de marzo de 2022]; 27(2): 47-60. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-971X2014000200005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2014000200005&lng=en)
68. Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Uni Odontol.* 2014 julio-diciembre; 33 (71): 65-73.
69. Biswas S, Biswas I. Secuencia completa del genoma de *Streptococcus mutans* GS-5, una cepa del serotipo c. *J Bacteriol.* 2012 septiembre; 194 (17): 4787-4788.
70. Nakano K, Ooshima T Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Futurc Microbio!* 2009; 4:89 1902
71. Nakano K, Lapirattanakul J, Nomura R, et al. *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (8): 2616-25.
72. Momeni S, Ghazal T, Grenett H, Whiddon J, et al. *Streptococcus mutans* serotypes and collagen-binding proteins Cnm/Cbm in children with caries analysed by PCR. *Mol Oral Microbiol* 2019 Apr;34(2):64-73.



73. Galgowski C, Rau M, Althoff S, Guedes A, et al. Mollicute Anti-Adhesive and Growth Inhibition Properties of the Methanolic Extract of Propolis from the Brazilian Native Bee *Melipona quadrifasciata*. *Chem Biodivers*. 2021 Jan;18(1): e2000711.
74. Cosco D. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* manzanilla. [Tesis para optar el Grado de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.

## 14.ANEXOS

**Anexo 1:** Esquema para la identificación de *S. sobrinus* y de las variantes de *S. mutans* melibiosa-positivo y melibiosa-negativo.

	<i>S. sobrinus</i> (n = 36)	<i>S. mutans</i> (n = 174) <sup>a</sup>		
		all	meli- biose- negative	meli- biose- positive
$\alpha$ -Glucosidase	100 <sup>b</sup>	91	20	100
$\beta$ -Glucosidase	6	97	75	100
$\alpha$ -Galactosidase	0	86	5	97
<b>Acid from</b>				
Amygdalin	0	81	20	89
Arbutin	0	94	75	97
Inulin	84	100	100	100
Lactose	87	99	100	98
Mannitol	61	100	100	100
Melibiose	0	89	0	100
N-Acetylglucosamine	0	100	100	100
Raffinose	3	91	20	100
Sorbitol	16	100	100	100
<b>Hydrolysis of</b>				
Aesculin	0	94	60	98
Arginine	0	0	0	0

All strains fermented glucose.

<sup>a</sup> Twenty strains were melibiose-negative and 154 strains were melibiose-positive.

<sup>b</sup> Percentage of strains positive.

**Anexo 2:** Primers SMUT utilizado con sus respectivas concentraciones para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

SMUT5: TGA AAC CTT GTC TAT CTC CTC TTT ACC

SMUT3: TCA GTT TTC AAA GGG CTC TG

Solución para un volumen total de 20 ul para la ejecución del PCR

	[STOCK]	[FINAL]	20 ul
<b>Agua</b>			12.9 ul
<b>Buffer PCR</b>	10 X	1 X	2 ul
<b>dNTPs</b>	10 mM	0.2 mM	0.4 ul
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1.5 mM	1.2 ul
<b>Primer forward (SMUT'5)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Primer reverse (SMUT'3)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Taq DNA polimerasa</b>	5 U/ul	2.5 U/ul	0.5 ul
<b>ADN template</b>		10 ng	1ul

Y para la identificación de los serotipos C, E, F y K de *S. mutans*, fue empleando los primers específicos:

SC-F: CGG AGT GCT TTT TAC AAG TGC TGG

SC-R: AAC CAC GGC CAG CAA ACC CTT TAT

SE-F: CCT GCT TTT CAA GTA CCT TTC GCC

SE-R: CTG CTT GCC AAG CCC TAC TAG AAA

SF-F: CCC ACA ATT GGC TTC AAG AGG AGA

SF-R: TGC GAA ACC ATA AGC ATA GCG AGG

Solución para un volumen total de 20 ul para la ejecución del PCR

	[STOCK]	[FINAL]	20 ul
<b>Agua</b>			8.9
<b>Buffer PCR</b>	10 X	1 X	2 ul
<b>dNTPs</b>	10 mM	0.2 mM	0.4 ul
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1.5 mM	1.2 ul
<b>Primer forward (c)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Primer reverse (c)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Primer forward (f)</b>	10 uM	0.2 uM	1ul
<b>Primer reverse (f)</b>	10 uM	0.2 uM	1ul
<b>Primer forward (e)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Primer reverse (e)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Taq DNA polimerasa</b>	5 U/u	2.5 U/ul	0.5 ul
<b>ADN template</b>		10 - 50 ng	1 ul

CEFK-F: ATT CCC GCC GTT GGA CCA TTC C

k-R: CCA ATG TGA TTC ATC CCA TAC C

Solución para un volumen total de 20 ul para la ejecución del PCR

	[STOCK]	[FINAL]	20 ul
<b>Agua</b>			12.9
<b>Buffer PCR</b>	10 X	1 X	2 ul
<b>dNTPs</b>	10 mM	0.2 mM	0.4 ul
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	1.5 mM	1.2 ul
<b>Primer forward (k)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Primer reverse (k)</b>	10 uM	0.2 uM	1 ul
<b>Taq DNA polimerasa</b>	5 U/ul	0.1 U/ul	0.5 ul
<b>ADN template</b>		10 - 50 ng	1 ul

### Anexo 3: Aprobación del comité de ética



#### CONSTANCIA 324-13-18

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXPEDITA**. La aprobación será ratificada en la sesión del comité más próxima a la fecha de emisión de este documento.

Título del Proyecto : "Efecto inhibitorio del propóleo peruano en los diferentes serotipos aislados de *Streptococcus mutans* para la disminución de la placa dental blanda en pacientes con problemas de caries".

Código de inscripción : 102214

Investigador principal : Vargas Gil, Mayra Lizeth

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. **Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 15 de junio del 2018.
2. **Asentimiento informado (menores de 12 años)**, versión 1.0 de fecha 12 de junio del 2018.
3. **Consentimiento informado (padres)**, versión 1.0 de fecha 15 de mayo del 2018.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **18 de junio del 2019**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 19 de junio del 2018.

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



/s/

#### Anexo 4: Asentimiento informado (menores de 12 años)

##### ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

(Menores de 12 años)	
<b>Título del estudio :</b>	<b>Efecto inhibitorio del propóleo de origen peruano en los diferentes serotipos aislados de <i>Streptococcus mutans</i> para la disminución de la placa dental blanda en pacientes con problemas de caries</b>
<b>Investigador (a) :</b>	<b>Mayra Lizeth Vargas Gil</b>
<b>Institución :</b>	<b>Universidad Peruana Cayetano Heredia</b>

#### Propósito del Estudio:

Hola señor padre de familia, mi nombre es Mayra Lizeth Vargas Gil, se está invitando a su hijo(a) a participar en un estudio donde se evaluará la utilidad del propóleo de origen peruano para saber si tienes un efecto inhibitorio en los diferentes serotipos aislados de *Streptococcus mutans* para la disminución de la placa dental blanda en pacientes con problemas de caries. Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

La placa dental representa un agente etiológico para el desarrollo de caries dentales y enfermedades periodontales, enfermedades altamente prevalentes entre el 90% y el 95% de la población peruana, especialmente en niños menores de 12 años; este estudio evaluará la actividad antibacteriana del propóleo de origen peruano "provincia de Chanchamayo – San Ramón" y medir su efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro de los diferentes serotipos de *Streptococcus mutans* las cuales serán aisladas de pacientes con caries y problemas de placa blanda dental.

Si usted acepta que su hijo participe se le realizará lo siguiente:

Se le tomará una muestra placa dental blanda debido a la presencia de caries, este procedimiento será realizado por un profesional de la salud bucal (odontólogo)

No deberás pagar nada por participar en el estudio. Igualmente, no recibirás dinero.

El beneficio es que a su hijo(a) se le brindara una educación sanitaria sobre los beneficios de tener una correcta higiene dental y de cómo prevenir la carie dental. Los costos de todos los exámenes serán cubiertos por el estudio y no le ocasionarán gasto alguno.

No tienes que colaborar con nosotros si no quieres. Si no lo haces está bien.

Si deseas hablar con alguien acerca de este estudio puedes llamar a: Tesista Mayra Lizeth Vargas Gil al teléfono: 969714659. También puedes llamar a la Dra. Frine Samalvides Cuba, presidenta del Comité Institucional de Ética en Investigación, al teléfono 01-319 0000 anexo 201355.

---

**ASENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

**(Menores de 12 años)**

<b>Título del estudio :</b>	<b>Efecto inhibitorio del propóleo de origen peruano en los diferentes serotipos aislados de <i>Streptococcus mutans</i> para la disminución de la placa dental blanda en pacientes con problemas de caries</b>
<b>Investigador (a) :</b>	<b>Mayra Lizeth Vargas Gil</b>
<b>Institución :</b>	<b>Universidad Peruana Cayetano Heredia</b>

¿Tienes alguna pregunta?

¿Deseas Colaborar con nosotros?

Si ( )

No ( )

\_\_\_\_\_  
**Testigo (si el participante es analfabeto)**

\_\_\_\_\_  
**Fecha y Hora**

\_\_\_\_\_  
**Nombres y Apellidos Investigador**

\_\_\_\_\_  
**Fecha y Hora**

## Anexo 5: Consentimiento informado (padres)

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

(Padres)

<b>Título del estudio :</b>	<b>Efecto inhibitorio del propóleo de origen peruano en los diferentes serotipos aislados de <i>Streptococcus mutans</i> para la disminución de la placa dental blanda en pacientes con problemas de caries</b>
<b>Investigador (a) :</b>	<b>Mayra Lizeth Vargas Gil</b>
<b>Institución :</b>	<b>Universidad Peruana Cayetano Heredia</b>

#### Propósito del estudio:

Se está invitando a su hijo(a) a participar en un estudio donde se evaluará la utilidad del propóleo de origen peruano para saber si tienes un efecto inhibitorio en los diferentes serotipos aislados de *Streptococcus mutans* para la disminución de la placa dental blanda en pacientes con problemas de caries. Este es un estudio desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

La placa dental representa un agente etiológico para el desarrollo de caries dentales y enfermedades periodontales, enfermedades altamente prevalentes entre el 90% y el 95% de la población peruana, especialmente en niños menores de 12 años; este estudio evaluará la actividad antibacteriana del propóleo de origen peruano "provincia de Chanchamayo – San Ramón" y medir su efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro de los diferentes serotipos de *Streptococcus mutans* las cuales serán aisladas de pacientes con caries y problemas de placa blanda dental.

#### Procedimientos:

Si usted acepta que su hijo participe y su hijo decide participar en este estudio se le realizará lo siguiente:

1. Se le tomará una muestra de placa dental blanda debido a la presencia de caries, este procedimiento será realizado por un profesional de la salud bucal (odontólogo)

#### Riesgos:

La toma de muestra de placa dental blanda es casi indolora debido a que se realizara un raspado superficial del diente y existe un riesgo muy pequeño de que se pueda causar un ligero sangrado en la encía sin causar infección.

#### Beneficios:

A su hijo(a) se le brindara una educación sanitaria sobre los beneficios de tener una correcta higiene dental y de cómo prevenir la carie dental. Los costos de todos los exámenes serán cubiertos por el estudio y no le ocasionarán gasto alguno.

#### Costos y compensación

No deberá pagar nada por la participación de su hijo(a) en el estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole.

#### Confidencialidad:

Nosotros guardaremos la información de su hijo(a) con códigos y no con nombres. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de su hijo(a) o de otros participantes del estudio.



---

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN**

<b>(Padres)</b>	
<b>Título del estudio :</b>	<b>Efecto inhibitorio del propóleo de origen peruano en los diferentes serotipos aislados de Streptococcus mutans para la disminución de la placa dental blanda en pacientes con problemas de caries</b>
<b>Investigador (a) :</b>	<b>Mayra Lizeth Vargas Gil</b>
<b>Institución :</b>	<b>Universidad Peruana Cayetano Heredia</b>

**Derechos del participante:**

Si usted decide que su hijo(a) participe en el estudio, podrá retirarse de éste en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin daño alguno. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte a Mayra Lizeth Vargas Gil, al teléfono 969714659.

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que su hijo(a) ha sido tratado injustamente puede contactar a la Dra. Frine Samalvides Cuba, presidenta del Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia al teléfono 01-3190000 anexo 2271 o al correo electrónico: [duict.cieh@oficinas-upch.pe](mailto:duict.cieh@oficinas-upch.pe)

Una copia de este consentimiento informado le será entregada.

**DECLARACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO**

Acepto voluntariamente que mi hijo(a) participe en este estudio, comprendo de las actividades en las que participará si ingresa al estudio, también entiendo que mi hijo(a) puede decidir no participar y que puede retirarse del estudio en cualquier momento.

---

**Nombres y Apellidos  
Participante**

---

**Fecha y Hora**

---

**Nombres y Apellidos  
Testigo**

---

**Fecha y Hora**

---

**Nombres y Apellidos  
Investigador**

---

**Fecha y Hora**

## Anexo 6: Base de datos elaborada en EXCEL

N	Cepas	DMSO + agua milli q			Promedio	Mediana	Clorexidina (mm)			Promedio	Mediana	Propoleo (mm)			Promedio	Mediana
1	ATCC	0	0	0	0	0	15	14.5	15	14.8333333	15	10	10.5	10	10.1666667	10
2	C147	0	0	0	0	0	23	24.5	23.5	23.6666667	23.5	19	20	20	19.6666667	20
3	S13	0	0	0	0	0	23	23	23	23	23	21.5	22	21.5	21.6666667	21.5
4	C141	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
5	A29b	0	0	0	0	0	12	12	12	12	12	10	10	10	10	10
6	K1	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11	10	10	10	10	10
7	Eve	0	0	0	0	0	11.5	11.5	11.5	11.5	11.5	8.5	9.5	9.5	9.1666667	9.5
8	C13#	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11	8.5	9	9	8.8333333	9
9	T21	0	0	0	0	0	12	12	11	11.6666667	12	10	10	9	9.6666667	10
10	H3	0	0	0	0	0	11	11.5	11.5	11.3333333	11.5	10	10	10	10	10
11	P57	0	0	0	0	0	25.5	25.5	25	25.3333333	25.5	23	23.5	24	23.5	23.5
12	T14	0	0	0	0	0	24	24	23	23.6666667	24	22	23	23	22.6666667	23
13	K11	0	0	0	0	0	13	13	13	13	13	12	12	13	12.3333333	12
14	X9	0	0	0	0	0	12	12.5	12	12.1666667	12	10	10	9	9.6666667	10
15	CbN	0	0	0	0	0	22	23	22	22.3333333	22	21	21	21	21	21
16	S5b	0	0	0	0	0	21	20	20	20.3333333	20	18	17.5	18	17.8333333	18
17	K2	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11	10	9	10	9.6666667	10
18	K5	0	0	0	0	0	24	24	24	24	24	21.5	22	22	21.8333333	22
19	H5	0	0	0	0	0	17	17	17	17	17	16.5	16	16	16.1666667	16
20	A10P	0	0	0	0	0	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5	15	16	16.5	15.8333333	16
21	X14	0	0	0	0	0	22.5	23	23	22.8333333	23	22	22.5	22.5	22.3333333	22.5
22	S9T	0	0	0	0	0	18	18	18	18	18	16	16.5	16.5	16.3333333	16.5
23	N2	0	0	0	0	0	28	28	27.5	27.8333333	28	25	25	24.5	24.8333333	25
24	L1	0	0	0	0	0	10.5	10.5	11	10.6666667	10.5	9.5	10	10.5	10	10
25	L9	0	0	0	0	0	10.5	10.5	11	10.6666667	10.5	9.5	9.5	10.5	9.8333333	9.5
26	L4	0	0	0	0	0	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10	9	10	9.6666667	10
27	L7	0	0	0	0	0	10	10	11	10.3333333	10	9	9	9.5	9.1666667	9
28	L6	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	8	8	8	8	8
29	C149	0	0	0	0	0	21	21	20	20.6666667	21	16	15	15	15.3333333	15
30	L10	0	0	0	0	0	10	10	11	10.3333333	10	9	9	10	9.3333333	9
31	M42b	0	0	0	0	0	22	22	21	21.6666667	22	16	15	15.5	15.5	15.5
32	C95B	0	0	0	0	0	21.5	21.5	21	21.3333333	21.5	19	19	19.5	19.1666667	19
33	S144	0	0	0	0	0	21	22	22	21.6666667	22	17.5	18	17.5	17.6666667	17.5
34	L2	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9
35	L3	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9
36	L8	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	8	8	8	8	8
37	L5	0	0	0	0	0	20	21	20	20.3333333	20	16	16	15	15.6666667	16
38	L11	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9
39	SgN	0	0	0	0	0	12	11	12	11.6666667	12	10	10	11	10.3333333	10
40	SRT	0	0	0	0	0	13	13	14	13.3333333	13	9.5	9.5	10	9.6666667	9.5
41	R21	0	0	0	0	0	24	25	25	24.6666667	25	19	20.5	20.5	20	20.5
42	S1B	0	0	0	0	0	11	12.5	12.5	12	12.5	9	10.5	10.5	10	10.5
43	C98C	0	0	0	0	0	16	16	17	16.3333333	16	10	10	11	10.3333333	10
44	R1	0	0	0	0	0	17	17	18	17.3333333	17	11	12	12	11.6666667	12
45	A101	0	0	0	0	0	12	12	12	12	12	10	10.5	10.5	10.3333333	10.5
46	S146	0	0	0	0	0	23	23	23.5	23.1666667	23	16	16	17	16.3333333	16
47	C89	0	0	0	0	0	12	13	13.5	12.8333333	13	10	11.5	11	10.8333333	11
48	X7	0	0	0	0	0	10.5	10.5	11	10.6666667	10.5	7	7	7	7	7
49	X11	0	0	0	0	0	19	19	20	19.3333333	19	18.5	18.5	18.5	18.5	18.5
50	A9	0	0	0	0	0	23.5	24	23	23.5	23.5	16	16	15.5	15.8333333	16
51	S9T	0	0	0	0	0	15	15	14.5	14.8333333	15	10.5	11	11	10.8333333	11
52	X4	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	7	7	7	7	7
53	S145	0	0	0	0	0	11.5	11	11.5	11.3333333	11.5	10	10	10	10	10
54	X1	0	0	0	0	0	21	21	22	21.3333333	21	14	14	15	14.3333333	14
55	H4	0	0	0	0	0	26	26.5	25	25.8333333	26	21	22.5	22	21.8333333	22
56	X5	0	0	0	0	0	20.5	21	21	20.8333333	21	15	14.5	15	14.8333333	15
57	X13	0	0	0	0	0	10.5	11.5	11.5	11.1666667	11.5	10	10	10	10	10
58	C57b	0	0	0	0	0	20.5	20	21	20.5	20.5	18	17	18.5	17.8333333	18
59	X2	0	0	0	0	0	10.5	11.5	11.5	11.1666667	11.5	9	10.5	10.5	10	10.5
60	A7	0	0	0	0	0	11.5	12.5	11	11.6666667	11.5	10	11	10	10.3333333	10
61	C43	0	0	0	0	0	14	14	14	14	14	10	10	10.5	10.1666667	10
62	C95	0	0	0	0	0	16	25.5	16.5	19.3333333	16.5	19.5	20	20	19.8333333	20
63	M35	0	0	0	0	0	18	17	18	17.6666667	18	16	15	15	15.3333333	15
64	C37	0	0	0	0	0	11	11.5	12	11.5	11.5	10	10	10.5	10.1666667	10
65	C149	0	0	0	0	0	25	24.5	24	24.5	24.5	18	18.5	18	18.1666667	18
66	C89N	0	0	0	0	0	10	10.5	10	10.1666667	10	9	9	9	9	9
67	X8	0	0	0	0	0	12	12	12.5	12.1666667	12	10	10	10	10	10
68	C226	0	0	0	0	0	11	12	12.5	11.8333333	12	9.5	10	10	9.8333333	10
69	SgM	0	0	0	0	0	11	12	12	11.6666667	12	10	11	11	10.6666667	11
70	A1	0	0	0	0	0	26	26	25	25.6666667	26	21	20	20.5	20.5	20.5
71	X15	0	0	0	0	0	19.5	19	19.5	19.3333333	19.5	15	14	14.5	14.5	14.5
72	C65N	0	0	0	0	0	25	24	25	24.6666667	25	21	20.5	21	20.8333333	21
73	X10	0	0	0	0	0	20	19.5	20	19.8333333	20	15	14.5	15	14.8333333	15
74	S154	0	0	0	0	0	11	10.5	10.5	10.6666667	10.5	10.5	10	10	10.1666667	10
75	T11	0	0	0	0	0	26	26	25	25.6666667	26	19.5	20	19.5	19.6666667	19.5

76	C37b	0	0	0	0	0	11	12	12	11.6666667	12	10	11.5	11	10.8333333	11
77	K6	0	0	0	0	0	11	11.5	12	11.5	11.5	9.5	10	10.5	10	10
78	K9	0	0	0	0	0	11.5	12	12.5	12	12	9	9.5	10.5	9.6666667	9.5
79	T25	0	0	0	0	0	11	12	11	11.3333333	11	9	10	9	9.3333333	9
80	C87	0	0	0	0	0	12	13	13	12.6666667	13	10	11.5	11	10.8333333	11
81	T1	0	0	0	0	0	11	10	10.5	10.5	10.5	9	9.5	9.5	9.3333333	9.5
82	X3	0	0	0	0	0	18	17	18	17.6666667	18	12.5	13	13	12.8333333	13
83	S84	0	0	0	0	0	25	24.5	24	24.5	24.5	17	18	17	17.3333333	17
84	Ci	0	0	0	0	0	15	14	14	14.3333333	14	10.5	9	10	9.8333333	10
85	305	0	0	0	0	0	14.5	13.5	14	14	14	13	12	12.5	12.5	12.5
86	T25	0	0	0	0	0	11	11	11.5	11.6666667	11	10	9	9.5	9.5	9.5
87	1	0	0	0	0	0	25	26	25.5	25.5	25.5	24	24	24.5	24.6666667	24
88	S6	0	0	0	0	0	25	26	25.5	25.5	25.5	23	23	22.5	22.8333333	23
89	T13	0	0	0	0	0	12	13	12.5	12.5	12.5	11	10.5	11	10.8333333	11
90	20C	0	0	0	0	0	23	22	22.5	22.5	22.5	21	20	20.5	20.5	20.5
91	S105n	0	0	0	0	0	26	27	26	26.3333333	26	24	25	24.5	24.5	24.5
92	Cf	0	0	0	0	0	21	20.5	21	20.8333333	21	20	19	20	19.6666667	20
93	C91	0	0	0	0	0	27	27	27	27	27	25	26	27	26	26
94	K3	0	0	0	0	0	16	17	16.5	16.5	16.5	13	14	13.5	13.5	13.5
95	M43	0	0	0	0	0	12	13	12.5	12.5	12.5	11	11.5	11.5	11.3333333	11.5
96	S130	0	0	0	0	0	24	25	24.5	24.5	24.5	20	21.5	20.5	20.6666667	20.5
97	T20	0	0	0	0	0	21	22	21	21.3333333	21	14	14	15	14.3333333	14
98	C155b	0	0	0	0	0	24	24	23.5	23.8333333	24	20	20	19.5	19.8333333	20
99	H1	0	0	0	0	0	23	22.5	22.4	22.6333333	22.5	19	20.5	19.5	19.6666667	19.5
100	S45B	0	0	0	0	0	24.5	25	25	24.8333333	25	23.5	23.5	23	23.3333333	23.5
101	S95	0	0	0	0	0	24	23	23.5	23.5	23.5	23	22	22.5	22.5	22.5
102	S5	0	0	0	0	0	25.5	25	25.5	25.3333333	25.5	19.5	20	19.5	19.6666667	19.5
103	J1	0	0	0	0	0	21	22	21.5	21.5	21.5	20	20	19.5	19.8333333	20
104	C11	0	0	0	0	0	22.5	22	22.5	22.3333333	22.5	22	21	21	21.3333333	21
105	C4	0	0	0	0	0	24	25	24.5	24.5	24.5	20	19.5	20	19.8333333	20
106	H10	0	0	0	0	0	15	14	14.5	14.5	14.5	9	10	9.5	9.5	9.5
107	T40	0	0	0	0	0	15	16	15.5	15.5	15.5	10	10.5	11	10.5	10.5
108	M42	0	0	0	0	0	19.5	20	19	19.5	19.5	13	13.5	12	12.8333333	13
109	X6	0	0	0	0	0	17	16	16.5	16.5	16.5	11.5	12	11	11.5	11.5
110	X12	0	0	0	0	0	19	18	19.5	18.8333333	19	10	11	11.5	10.8333333	11
111	7C	0	0	0	0	0	25.5	26	25	25.5	25.5	23	24.5	24	23.8333333	24
112	S1	0	0	0	0	0	24	24	23.5	23.8333333	24	21.5	21	22	21.5	21.5
113	X0	0	0	0	0	0	15	15.5	16	15.5	15.5	9	10	9.5	9.5	9.5
114	Chn	0	0	0	0	0	23	23	22	22.6666667	23	20	19	19	19.3333333	19
115	T9	0	0	0	0	0	13	12	12	12.3333333	12	10	10.5	10	10.6666667	10
116	T41	0	0	0	0	0	15	15	15	15	15	11	12	11	11.3333333	11
117	C37b	0	0	0	0	0	20	20	20.5	20.6666667	20	18	17	17.5	17.5	17.5
118	T89	0	0	0	0	0	14	13	13.5	13.5	13.5	9.5	9	9.5	9.3333333	9.5
119	M40	0	0	0	0	0	12	13	12.5	12.5	12.5	10	11	10.5	10.5	10.5
120	19C	0	0	0	0	0	20	20	20	20	20	16	16	15.5	15.8333333	16
121	M33	0	0	0	0	0	15	14	14	14.3333333	14	10	10	10	10	10
122	T26	0	0	0	0	0	12	12.5	13	12.5	12.5	13	11	11.5	11.8333333	11.5
123	K8	0	0	0	0	0	16	15.5	16	15.8333333	16	12.5	13.5	12.5	12.8333333	12.5
124	R3	0	0	0	0	0	15.5	14	14.5	14.6666667	14.5	10.5	10	10	10.6666667	10
125	M37	0	0	0	0	0	14	15	14	14.3333333	14	12	11	11.5	11.5	11.5
126	N12	0	0	0	0	0	14	15	14	14.3333333	14	12	11	11.5	11.5	11.5
127	M39	0	0	0	0	0	14	13.5	13	13.5	13.5	12	11.5	12	11.8333333	12
128	T8	0	0	0	0	0	12.5	13	12.5	12.6666667	12.5	9	9	8.5	8.8333333	9
129	K7	0	0	0	0	0	12.5	12.5	12	12.3333333	12.5	9	9.5	10	9.5	9.5
130	S24	0	0	0	0	0	20	19	19.5	19.5	19.5	15	15	15.5	15.6666667	15
131	M10	0	0	0	0	0	13.5	14	14	13.8333333	14	10	11	10.5	10.5	10.5
132	S108	0	0	0	0	0	14	15	14.5	14.5	14.5	12	13	13	12.6666667	13
133	A2	0	0	0	0	0	16	16	17	16.3333333	16	12	11	11.5	11.5	11.5
134	N10	0	0	0	0	0	15	16	15.5	15.5	15.5	9	10	9.5	9.5	9.5
135	S103	0	0	0	0	0	12	13	12	12.3333333	12	10	10	11	10.3333333	10
136	S42N	0	0	0	0	0	20	20	20	20	20	13	13	12.5	12.8333333	13
137	M38	0	0	0	0	0	12	12.5	13	12.5	12.5	9	10.5	10.5	10	10.5
138	S42T	0	0	0	0	0	14.5	14.5	14	14.3333333	14.5	10	11	11	10.6666667	11
139	M41	0	0	0	0	0	16	16	16.5	16.6666667	16	12	12	12.5	12.6666667	12