

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



**“ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO INHIBITORIO DE DOS
YOGURES CON CEPAS PROBIÓTICAS ANTE LA
PROLIFERACIÓN DEL *Streptococcus mutans* BUCAL- PUNO 2017”**

TESIS

PRESENTADA POR:

CLAUDIA LIGUE CATI

EDWIN RENE QUISPE RONCALLA

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

CIRUJANO DENTISTA

PUNO – PERÚ

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA**

**ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO INHIBITORIO DE DOS YOGURES CON
CEPAS PROBIÓTICAS ANTE LA PROLIFERACIÓN DEL *Streptococcus*
mutans BUCAL - PUNO 2017.**

PRESENTADA POR:

**CLAUDIA LIGUE CATI
EDWIN RENE QUISPE RONCALLA**

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

CIRUJANO DENTISTA



APROBADO POR EL JURADO DICTAMINADOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE:



Dr. JORGE LUIS MERCADO PORTAL

PRIMER MIEMBRO:



CD. BETSY QUISPE QUISPE

SEGUNDO MIEMBRO:



CD. NELLY BEATRIZ QUISPE MAQUERA

DIRECTOR / ASESOR:



CD. CESAR AUGUSTO MOLINA DELAGADO

Área : Ciencias De La Salud
Tema : Medicina Estomatológica

Fecha de sustentación: 13 / 12 / 2017

DEDICATORIA

Nuestro trabajo de investigación va dedicado con todo cariño a nuestros queridos padres quienes nos dieron vida, educación, apoyo y consejos durante toda nuestra formación personal y profesional.

A nuestros preciosos hijos Eddan Rafael y Briana Yulieth quienes son nuestro principal motivo para seguir adelante.

A nuestra familia principalmente a hermanos por el apoyo incondicional en cada paso de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestra primera casa de estudios Universidad Nacional del Altiplano Puno, a la Escuela Profesional De Odontología, alma mater que nos acogió para poder realizarnos como profesionales de éxito.

Agradecemos a cada uno de nuestros docentes quienes aportaron de manera substancial en nuestra formación académica profesional, principalmente a nuestro asesor: Dr. Cesar A. Molina, a nuestros jurados: Dr. Jorge L. Mercado P., Dra. Betsy Quispe Q., Dra. Nelly B. Quispe M. a nuestro asesor de laboratorio Lic. Biólogo Lorgio Palacios F. a todos ellos por su gran aporte para la ejecución y elaboración del presente trabajo de investigación.

Agradecemos a Dios por guardarnos y bendecirnos durante todo este tiempo, primordialmente por darnos fortaleza, sabiduría y salud.

ÍNDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE GRAFICOS	9
ÍNDICE DE ACRONIMOS.....	10
RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
CAPITULO I.....	13
1. INTRODUCCION	13
1.1 EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
1.2 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	16
1.3 FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION.....	19
1.4 IMPORTANCIA Y UTILIDAD DEL ESTUDIO	19
1.5 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	19
CAPITULO II.....	21
2.1. MARCO TEORICO	21
2.1.1. PROBIOTICO	21
2.1.2. DIFINICIONES DE PROBIOTIOS.....	21
2.1.3. PROBIÓTICOS Y SALUD ORAL.....	22
2.1.4. MECANISMOS DE ACCION.....	24
2.1.5. CARACTERISTICAS	26
2.1.6. TIPOS DE PROBIÓTICOS.....	27
2.1.7. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN.....	28
2.1.9 YOGUR ENRIQUECIDO CON CULTIVOS PROBIÓTICOS	29
2.1.10. RIESGOS EN EL CONSUMO DEL YOGUR CON PROBIOTICOS. ...	29
2.2. STREPTOCOCOS MUTANS.....	30
2.3. HIPOTESIS	35

CAPITULO III.....	36
3. MATERIALES Y METODOS.....	36
3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACION.....	36
3.2. POBLACION Y MUESTRA	36
3.3. GRUPOS DE ESTUDIO	37
3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	38
3.5. TECNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS.....	38
3.5.1. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCION DE DATOS.....	38
CAPITULO IV	47
4.1 RESULTADOS	47
4.2 DISCUSIÓN.....	55
CONCLUSIONES.....	58
RECOMENDACIONES.....	59
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	60
ANEXOS	63

INDICE DE FIGURAS

1.	Figura N° 1: Mecanismo de acción de los probióticos.....	25
2.	Figura N° 2: Principales Características De Los Probióticos.....	26
3.	Figura N° 3: Bacterias Empleadas Como Probióticos.....	27
4.	Figura N° 4: Criterios más importantes para la clasificación del Género <i>Streptococcus</i>	30
5.	Figura N° 5: Grupos de especies de <i>Streptococcus</i> sobre la base del análisis de secuencia de rRNA de subunidades pequeñas	31
6.	Figura N° 6: TABLA DE OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.....	38

INDICE DE TABLAS

1.	TABLA N° 1. CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i> A LAS 24 Y 48 HORAS.....	47
2.	TABLA N° 2. CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i> a las 24 y 48 horas.	49
3.	TABLA N° 3. COMPARACION DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i> a las 24 HORAS.....	51
4.	TABLA N° 4. COMPARACION DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i> a las 48 HORAS.....	53

INDICE DE GRAFICOS

1. GRAFICO N° 1. Contraste de Tukey ($gl=18$, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 1 en tiempos de 24 y 48 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*. 48
2. GRAFICO N° 2. Contraste de Tukey ($gl=18$, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 2 en tiempos de 24 y 48 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*. 50
3. GRAFICO N° 3. Contraste de Tukey ($gl=18$, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 1 y yogur 2 a las 24 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*. 52
4. GRAFICO N° 4. Contraste de Tukey ($gl=18$, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 1 y yogur 2 a las 48 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*. 54

ÍNDICE DE ACRONIMOS

Yogur N° 1	: Yogur enriquecido con cepas probióticas, el cual es un producto de elaboración y alcance nacional.
Yogur N° 2	: Yogur enriquecido con cepas probióticas, el cual es un producto de elaboración y alcance en nuestro medio local.
rRNA.	: El ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.
SM.	: Bacteria <i>Streptococcus mutans</i> Bucal.
DMS.	: Valor denominado Diferencia Mínima Significativa.
OMS	: Organización Mundial De La Salud
OPS	: Organización Panamericana de la Salud
PNCS	: Plan Nacional Concertado de Salud del PERU.
LCR32	: low molecular weightcysteinerich 32
LA	: bacterias <i>Lactobacillus acidophilus</i>
UFC	: Unidades Formadoras de Colonias.
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL - LAB	: Bacterias Acido Laticas.
FAO	: Food and Agricultural Organization
GE N° 1	: Grupo experimental numero 1
GE N° 2	: Grupo experimental numero 2
GE N° 3	: Grupo experimental numero 3 (grupo control)
D.E	: Desviación Estándar
LI	: Límite Inferior
LS	: Limite Superior

RESUMEN

El objetivo del presente estudio de investigación fue estudiar si existe efectividad inhibitoria de dos diferentes yogures que contienen cepas probioticas ante la proliferación del *Streptococcus mutans* bucal in vitro: **Materiales y Métodos:** Investigación in vitro responde al estudio de tipo experimental, prospectivo y longitudinal; donde la fase experimental fue dividido en tres grupos experimentales: (GE N°1) ensayo sometido con (yogur N°1), (GE N°2) ensayo sometido con (yogur N°2) y (GE N°3) grupo control donde se empleó un yogur de consumo común. Las cuales fueron inoculados en un numero equitativo de 10 Placas Petri para cada ensayo mismas que contenían cultivo del aislado de *Streptococcus mutans* Bucal (cepas nativas); cepas de *SM* que fueron obtenidas mediante procedimientos de aislamiento selectivo y corroborados por medio de pruebas bioquímicas; total de placas sometidas a incubación de 37°C para su posterior evaluación luego de las 24 y 48 horas. Como **Resultado** queda demostrado amenera objetiva en los promedio de halos de inhibición: (GE N°1) = 15.39mm correspondiente a (Yogur N°1), (GE N°2) = 12.64mm correspondiente a (Yogur N°2), teniendo una diferencia de 2.75 mm en favor del Yogur N°1 con un mejor comportamiento a las 24 h. (GE N°3) = 0mm correspondiente al grupo control. La prueba de tukey arrojó un resultado significativo (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41874) para el Yogur N° 1 y (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41103) para el Yogur N° 2. A manera comparativa entre ambas existe una diferencia significativa a favor del (Yogur N°1) efecto inhibitorio evaluada a las 24 horas (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41351). **Conclusión:** Los dos yogures enriquecidas con cepas probioticas si poseen efecto inhibitorio de carácter significativo ante la proliferación del *Streptococcus mutans* bucal in vitro. Por lo cual el consumo del yogur enriquecido con cepas probioticas podría ser una alternativa de prevención para contrarrestar el crecimiento y proliferación del *Streptococcus mutans* bucal principal agente cariogénico.

Palabras clave.

Cepas Probióticas, inhibición, *Streptococcus Mutans*.

ABSTRACT

The objective of the present research study was to study if there is inhibitory effectiveness of two different yogurts containing probiotic strains before the proliferation of oral mutans *Streptococcus mutans*: Materials and Methods: In vitro research responds to the experimental, prospective and longitudinal type study; where the experimental phase was divided into three experimental groups: (GE N° 1) test submitted with (yogurt N° 1), (GE N° 1) test submitted with (yogurt N° 2) and (GE N° 3) group control where a yoghurt of common consumption was used. Which were inoculated in an equitable number of 10 Petri dishes for each same assay that contained culture of the isolate of *Streptococcus mutans* Buccal (native strains); strains of SM that were obtained by selective isolation procedures and corroborated by means of biochemical tests; total of plates subjected to 37 ° C incubation for later evaluation after 24 and 48 hours. As a result is demonstrated objectively in the average inhibition halos: (GE N ° 1) = 15.39mm corresponding to (Yogurt N ° 1), (GE N ° 2) = 12.64mm corresponding to (Yogurt N ° 2), having a difference of 2.75 mm in favor of Yogurt N ° 1 with a better behavior at 24 h (GE N ° 3) = 0 mm corresponding to the control group. The tukey test yielded a significant result (Tukey Alpha = 0.05 DMS = 0.41874) for Yogurt No. 1 and (Tukey Alfa = 0.05 DMS = 0.41103) for Yogurt No. 2. By way of comparative between both there is a significant difference in favor of (Yogurt N ° 1) inhibitory effect evaluated at 24 hours (Tukey Alfa = 0.05 DMS = 0.41351). Conclusion: The two yogurts enriched with probiotic strains if they have significant inhibitory effect against the proliferation of oral mutans *Streptococcus mutans*. Therefore, the consumption of yogurt enriched with probiotic strains could be a prevention alternative to counteract the growth and proliferation of buccal *Streptococcus mutans* main cariogenic agent

Keywords.

Probiotics trains, inhibition, *Streptococcus Mutans*.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

Como lo señalan muchos investigadores en el campo de la salud bucal, las acciones preventivas son la mejor estrategia de afrontar los diversos problemas de salud desde el espacio geográfico de una comunidad hasta los de una nación y desde el orden individual hasta un orden poblacional. Por ello es necesario implementar nuevas estrategias, técnicas, y métodos en este caso el efecto del consumo de yogur probiótico en la prevención de la caries dental, se observó estudios en el cual actúa como antimicrobiano, inhibiendo el crecimiento de los *Streptococcus mutans*.

La caries dental ha sido de las afecciones de mayor prevalencia, y pese a que algunas investigaciones han señalado una marcada disminución en su aparición, la caries sigue siendo de los principales problemas de salud pública en el mundo (Roberson, 2007). Por su parte (Thylstrup&Fejerskov, 1986) explicaron citando a Miller (1890) la etiología de la caries, determinando mediante estudios en la placa dental que ciertos microorganismos existentes en ella, son los responsables de la lesión cariosa, entre estos el *Streptococcus mutans* que actúa desmineralizando la superficie dentaria. Más adelante se plantea un tratamiento restaurativo para dicha patología, pero actualmente existen numerosas terapias preventivas que gracias al conocimiento de la etiopatogenia de la caries permiten desarrollar medidas eficaces que ayudan a su control (Seif R. 1997). Con respecto a la prevención de caries mediante el uso de probióticos que inhiben el crecimiento de ciertas bacterias cariogénicas como el *Streptococcus mutans*¹

En el reporte de la organización mundial de la salud (OMS) Salud bucodental mediante la Nota informativa N°318 Abril de 2012 menciona como datos principales que el 60%-90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo, Las caries dentales pueden prevenirse manteniendo de forma constante una baja concentración de fluoruro en la cavidad bucal, Las enfermedades periodontales graves, que pueden desembocar en la pérdida de dientes, afectan a un 15%-20% de los adultos de edad media (35-44 años), Alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y los 74 años no tiene dientes naturales, Las dolencias

bucodentales, tanto en niños como en adultos, tienden a ser más frecuentes entre los grupos pobres y desfavorecidos, Son factores de riesgo para el padecimiento de enfermedades bucodentales, entre otros, la mala alimentación, el tabaquismo, el consumo nocivo de alcohol y la falta de higiene bucodental, aunque existen también diversos determinantes sociales. ²

La Salud Bucal en el Perú constituye un grave problema de Salud Pública, por lo que es necesario un abordaje integral del problema, aplicando medidas eficaces de promoción y prevención de la salud bucal. La población pobre al igual que la no pobre, presenta necesidades de tratamiento de enfermedades bucales, solo que la población pobre, tiene que verse en la necesidad de priorizar, entre gasto por alimentación y gasto por salud. ³

Según el Estudio Epidemiológico a nivel nacional realizado los años 2001-2002 la prevalencia de caries dental es de 90.4%; además en lo que se refiere a caries dental el índice de dientes cariados, perdidos y obturados (CPOD), a los 12 años es de aproximadamente 6, ubicándose según la Organización Panamericana de la Salud – OPS en un País en estado de emergencia; según un estudio del año 1990, la prevalencia de enfermedad periodontal fue de 85% y en estudios referenciales se estima que la prevalencia actual de mal oclusiones es del 80%. ³

El Plan Nacional Concertado de Salud (PNCS) identifica los problemas sanitarios del Perú y las iniciativas políticas de concertación para dirigir los esfuerzos y recursos a fin de mitigar esos daños, entre ellos señala la Alta Prevalencia de Enfermedades de la Cavidad Bucal como uno de los 12 principales problemas sanitarios en el Perú y el estado peruano tiene como respuesta a este problema sanitario, la estrategia sanitaria nacional de salud bucal. ³

La resistencia antibiótica con la emergencia de cepas multiresistentes es un problema global que va en aumento; este desarrollo lamentable ha llevado a los científicos a buscar otras formas de combatir las enfermedades infecciosas. Un nuevo método, el enfoque probiótico, es investigado con respecto a la eliminación de los microorganismos patogénicos. Los probióticos son microorganismos vivos, los cuales, administrados en cantidades adecuadas, brindan un beneficio en la salud del huésped. Las bacterias probióticas pueden ocasionar beneficios en la salud del huésped

brindándole nutrientes y cofactores, compitiendo directamente con los patógenos, interactuando con los factores de virulencia de éstos y estimulando la respuesta inmune del huésped. El efecto del tratamiento con probióticos ha sido estudiado extensamente para una diversidad de indicaciones sistémicas y desórdenes médicos. Por ejemplo, los beneficios potenciales de los probióticos han sido estudiados en desórdenes gastrointestinales ginecológicos y entre otras. Recientemente hay un interés creciente en el control probiótico contra las infecciones orales.^{3,4}

Las infecciones orales constituyen las formas más comunes de las infecciones en humanos. La cavidad oral es un ecosistema complejo en el cual se desarrolla una microbiota diversa. El amplio rango de pH, la disponibilidad de nutrientes, las superficies deslizantes y no deslizantes, la saliva, los fluidos creviculares y las comunidades microbianas fluctúan en composición y en actividad metabólica, pero llegan a una especie de homeostasis con el huésped. Los cambios en el ambiente, ya sean por enfermedad, conductas, dieta o medicamentos, alteran la homeostasis y permiten las infecciones endógenas o la susceptibilidad a las infecciones exógenas. La microflora oral residente es diversa y está compuesta por especies con diferentes requerimientos nutricionales (sacarolíticos, proteolíticos, consumidores secundarios), atmosféricos (aeróbicos, anaeróbicos, facultativos, microaerofílicos, capnofílicos) y físico-químicos (pH, co-factores). Las enfermedades dentales son una consecuencia de los cambios en la ecología señalada anteriormente. Si el ambiente local es perturbado, entonces los patógenos potenciales pueden ganar una ventaja competitiva y, bajo condiciones apropiadas, alcanzar números que predisponen a enfermedad. Presumiblemente la administración oral de probióticos puede beneficiar la salud oral previniendo el crecimiento de la microbiota nociva o modulando la inmunidad de la mucosa en la cavidad oral. Los estudios de los potenciales Probióticos orales se han enfocado en la prevención de la caries, especialmente en la posibilidad de reducir el número de *Streptococcus mutans* cuando se usan productos conteniendo ciertas cepas de probióticas. También se han investigado otras posibles aplicaciones, como la reducción del número de *Cándida* oral o de la microflora asociada con la halitosis. Sin embargo, existe limitada información disponible con respecto al efecto de los probióticos en la salud periodontal y sus condiciones clínicas.⁴

1.2 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.

1.2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.

Rebolledo et al. (2013) (Concepción, Chile) Objetivo: fue medir el efecto de las cepas probióticas *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* (LCR32) y *Lactobacillus johnsonii* (LA1) sobre el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. Se midió el efecto in vitro de las cepas de dos probióticos comercializados en Chile; *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* (LCR32) contenidas en Lactil® y *Lactobacillus johnsonii* (LA1) contenidas en Chamyto, sobre el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. **Metodología:** Se realizaron medios de cultivo selectivos para *Streptococcus mutans* a los cuales se les adicionaron cuatro diluciones diferentes de cada probiótico y se midió el halo de inhibición de los *Streptococcus mutans* con un pie de metro. Los probióticos con las cepas *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* (LCR32) y *Lactobacillus johnsonii* (LA1) inhiben el crecimiento sobre *Streptococcus mutans*. **Resultados:** Ambos probióticos en las dos concentraciones más altas no obtuvieron diferencias significativas en relación a los halos de inhibición. Sin embargo, el probiótico con la cepa *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* (LCR35), mostró halos de inhibición más significativos en comparación a la cepa *Lactobacillus johnsonii* (LA1). **Conclusión:** Las cepas probióticas *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* (LCR35) y *Lactobacillus Johnsonii* (LA1) disminuyen la colonización de las principales bacterias productoras de caries dental, de tal forma estos probióticos podrían ser utilizados como apoyo en la prevención y profilaxis de la enfermedad en pacientes de alto riesgo cariogénico, en forma adicional a otros medios de prevención.⁵

Valdéz J. (2016) (Quito, Ecuador) Objetivo de la presente investigación fue determinar si el *Lactobacillus casei* (variedad *rhamnosus*) del yogurt Toni LGG y de las cápsulas de Bacilor son efectivos para inhibir el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. **Metodología** consistió en una experimentación in vitro cuantitativa y comparativa **Resultados revelando** que el Probiótico *Lactobacillus casei* (variedad *rhamnosus*) del yogurt Toni posee un mayor efecto inhibitorio sobre el *S. mutans* que el de las cápsulas de Bacilar. **Conclusiones** El Probiótico *Lactobacillus casei* (variedad *rhamnosus*) del yogurt Toni LGG y de las cápsulas de Bacilar poseen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro del *Streptococcus mutans*, principal microorganismo causante de caries dental. El Probiótico *Lactobacillus casei* (variedad

rhamnosus) del yogurt Toni LGG posee mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro del *Streptococcus mutans*.¹

Hasslöf et al. (2010) (Umeå, Suecia) Objetivo del estudio fue investigar la capacidad de una selección de cepas de lactobacilos, usadas en productos probióticos comercialmente disponibles, para inhibir el crecimiento de los estreptococos orales mutans y *C. albicans* in vitro. **Métodos** Ocho cepas de probiótico lactobacilos fueron probados para la inhibición del crecimiento en tres cepas de referencia y dos aislados clínicos de mutans estreptococos, así como dos cepas de referencia y tres aislados clínicos de *Candida albicans* con un método de superposición de agar. **Resultados** A concentraciones que oscilaban entre 10⁹ y 10⁵ UFC / ml, todas las cepas de lactobacilos inhibían completamente el crecimiento de los estreptococos de mutans con la excepción de *L. acidophilus* La5 que ejecutaban sólo una ligera inhibición de algunas cepas a concentraciones correspondientes a 10⁷ y 10⁵ UFC / ml. En la concentración celular más baja (10³ UFC / ml), sólo *L. plantarum* 299v y *L. plantarum* 931 mostraron una inhibición total del crecimiento mientras que se observó una ligera inhibición para las cinco cepas de *Streptococcus mutans* por *L. rhamnosus* LB21, *L. paracasei* F19, *L. Reuter* PTA 5289 y *L. reuteri* ATCC 55730. Todas las cepas de lactobacilos ensayadas redujeron el crecimiento de *Candida* pero el efecto fue generalmente más débil que para los *Streptococcus mutans*. Las dos cepas de *L. plantarum* y *L. reuteri* ATCC 55730 mostraron la mayor inhibición de *Candida albicans*. No se observaron diferencias significativas entre las cepas de referencia y los aislados clínicos. **Conclusión** Las cepas probióticas seleccionadas mostraron una capacidad significativa, pero algo variable para inhibir el crecimiento de los *Streptococcus mutans* orales y *Candida albicans* in vitro.⁶

Shakir et al. (2013) (El Cairo, Egipto) Objetivo: evaluar el posible efecto inhibitorio de determinadas cepas bacterianas probióticas frente a *Streptococcus mutans* (SM) e identificar el producto lácteo más adecuado en el que la más potente cepa probiótica exhibirá actividad inhibidora contra SM. **Material y métodos:** Seis cepas probióticas incluyendo (*Lb reuteri* ATCC 23272, *Lb rhamnosus* ATCC7469, *Lb acidophilus* ATCC 4356, *Lb acidophilus* TISTR 450, *Lb Plantarum* ATCC 14917 y *Bifibifidium* DSM 20082) se ensayaron contra SM. Bioyogur, agitado fermentado Leche y queso kareishy se probaron como vehículo de entrega para la cepa probiótica más potente. **Resultados:**

Todos los probióticos en el grupo 1-6 reducen significativamente el porcentaje de supervivencia de SM en todos los subgrupos de relación, es decir, A - C (relación de 3: 1, 1: 1 y 1: 3 SM: cepa probiótica, respectivamente), con excepción del grupo 6 en la relación subgrupo A. Con Excepción de los grupos 4 y 5 en la proporción subgrupo A, diferencia estadísticamente significativa entre todos los probióticos en la Actividad inhibidora frente a SM en todos los subgrupos de relación probados (A - C). *Lb reuteri* ATCC 23272 mostrada más fuerte Actividad inhibidora seguida por *Lb. Rhamnosus* ATCC7469, *Bifi. Bifidium* DSM 20082, *Lb. Plantarum* ATCC 14917 entonces *Lb. Acidophilus* ATCC 4356 y la última *Lb. Acidophilus* TISTR 450 mostró los inhibidores más débiles actividad. *Lb reuteri* ATCC 23272 en leche fermentada agitada mostró la actividad inhibitoria más fuerte contra SM, **Conclusión:** Diferentes probióticos en estudio reducir el transporte oral de SM con grados variables. Movido La leche fermentada que contiene *Lb reuteri* ATCC 23272 se considera el mejor vehículo de entrega de probióticos para la prevención de caries dental.⁷

1.2.2 ANTECEDENTES NACIONALES.

Ríos et al. (2013) (Lima, Perú) Objetivo: Determinar el efecto inhibitorio in vitro, de un bioyogurt con cepas probióticas sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Materiales y método:** El estudio de tipo longitudinal, prospectivo y experimental se ajustó a un diseño de pre prueba - post prueba en dos grupos experimentales. Se utilizaron dos sistemas: sistema 1 constituido por bioyogurt sin cepas probióticas y sistema 2 constituido por yogurt con cepas probióticas, ambos fueron inoculados con la suspensión de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, evaluándose mediante recuento bacteriano a los 0, 4, 8, 12, 16, 20, y 24 horas. **Resultados:** El bioyogurt comercial con cepas probióticas, produjo una inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* de $1,4 \times 10^9$ UFC/ml a $0,083 \times 10^9$ UFC/ml ($p < 0,001$), mientras el yogurt comercial sin cepas probióticas, de 14×10^8 UFC/ml a $11,97 \times 10^8$ UFC/ml. **Conclusiones:** El bioyogurt LAIVE que contiene las cepas *Lactobacillus paracasei* sus. *Casei* *Lactobacillus acidophilus*, y *Bifidobacterium* tiene acción efecto inhibitorio “in vitro” sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mostrando una alta significancia $p < 0,001$, por lo que puede ser beneficioso en la prevención de la caries.⁸

1.2.3 ANTECEDENTES LOCALES.

No existen antecedentes y referencia bibliográfica sobre estudios que hayan tratado con cepas probióticas en nuestra localidad.

1.3 FORMULACION DEL PROBLEMA DE INVESTIGACION

En el Perú se constituye un grave problema de Salud Pública problemas que aquejan principalmente la salud bucal, específicamente los altos índices de caries dental teniendo a *Streptococcus mutans* como principal agente cariogénico, por lo que es necesario un abordaje integral del problema, aplicando medidas eficaces de promoción y prevención de la salud bucal; por ello formulamos que si ¿el yogur con cepas probióticas posee efectos inhibitorios ante del crecimiento, desarrollo y proliferación del *Streptococcus mutans* bucal?

1.4 IMPORTANCIA Y UTILIDAD DEL ESTUDIO

Resultados obtenidos y señalados por investigaciones que anteceden a nuestro estudio y resultados obtenidos en el presente estudio recomendamos a las autoridades pertinentes del estado a promover programas de abordaje a las poblaciones más vulnerables e incluir en sus dietas de alimentación saludables, Alimentos enriquecido con cepas probióticas podrían ser utilizados como apoyo en la prevención y profilaxis de las enfermedades a nivel bucal y como para la salud en general.

1.5 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.5.1. OBJETIVO GENERAL

1. Estudiar el efecto inhibitorio de dos yogures con cepas probióticas ante la proliferación del *Streptococcus mutans* bucal in vitro.

1.5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar La Capacidad Inhibitoria Del Yogur N° 1 Con Cepas Probioticas Ante La Proliferación Del *Streptococcus Mutans* Bucal a Las 24 Y 48 Horas.
2. Evaluar La Capacidad Inhibitoria De Yogur N° 2 Con Cepas Probioticas Ante La Proliferación Del *Streptococcus Mutans* Bucal a Las 24 Y 48 Horas.
3. Comparar La Capacidad Inhibitoria entre el Yogur N° 1 y el Yogur N° 2 con Cepas Probioticas Ante La Proliferación Del *Streptococcus Mutans* Bucal A Las

24 Horas.

4. Comparar La Capacidad Inhibitoria entre el Yogur N° 1 y el Yogur N° 2 con Cepas Probioticas Ante La Proliferación Del Streptococcus Mutans Bucal A Las 48 Horas.

1.6 CARACTERIZACION DEL AREA DE INVESTIGACION

1.6.1 AMBITO GENERAL

El ámbito en que se llevó a cabo la ejecución del presente estudio de investigación experimental corresponde a la Universidad Nacional Del Altiplano de la ciudad de Puno, la misma que se encuentra ubicada en la ciudad, provincia y departamento de Puno, ubicada en la parte sureste del territorio peruano, caracterizado por ser una ciudad que se alza a las riveras del majestuoso lago Titicaca. Estratégicamente sus límites son: por el norte con los departamentos de Cusco y Madre de Dios; por el sur con los departamentos de Moquegua y Tacna; por el oeste con los departamentos de Cusco y Arequipa y por el este con la República de Bolivia se encuentra en el altiplano entre los 3812 y 5500 msnm, cuenta con diversos atractivos de carácter natural (Lago Titicaca, lagunas, ríos, ceja de selva, flora, fauna, etc.) ruinas arqueológicas, templos coloniales y variado folclore.

1.6.1 AMBITO ESPECÍFICO

Específicamente el estudio experimental se realizó en los laboratorios de zoología y microbiología de la escuela profesional de ciencias biológicas y para la toma de muestras en la Clínica Odontológica De La Escuela Profesional De Odontología, ambas instituciones pertenecientes a la entidad de educación superior Universidad Nacional Del Altiplano Puno, teniendo como dirección legal en la Av. Sesquicentenario N° 1150 de la ciudad de Puno.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEORICO

2.1.1. PROBIOTICO

El término “Probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el huésped.⁴

Hace un siglo, Elie Metchnikoff (científico ruso, premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur en Paris) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad. Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando microbios útiles para sustituir a los microbios proteolíticos como *Clostridium* productores de sustancias tóxicas que surgen de la digestión de proteínas, entre las que se encuentran fenoles, indoles, y amoníaco. Desarrolló entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria, a la que denominó “bacilo búlgaro.” En 1917, antes del descubrimiento de Alexander Fleming de la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* de las heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote grave de shigellosis. La cepa de *Escherichia coli* de Nissle 1917 es uno de los pocos ejemplos de un probiótico no BAL. Henry Tissier (del Instituto Pasteur) aisló por primera vez una Bifidobacteria de un lactante alimentado a pecho, a la que denominó *Bacillus bifidus communis*.⁹

2.1.2. DIFINICIONES DE PROBIOTIOS

Los probióticos son microbios vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las usadas más comúnmente como probióticos, pero la levadura *Saccharom* y *cescerevisiae* y algunas

especies de *E. coli* y *Bacillus* también son utilizados como probióticos. Las bacterias de ácido láctico (LAB), entre las que se encuentra la especie *Lactobacillus*, han sido utilizadas para la conservación de alimentos mediante fermentación durante miles de años; pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos, pudiendo además generar efectos beneficiosos a la salud. En términos estrictos, sin embargo, el término “probiótico” debe reservarse para los microbios vivos que han demostrado en estudios humanos controlados producir un beneficio a la salud. La fermentación de alimentos brinda perfiles de sabor característicos y reduce el pH, lo que impide la contaminación provocada por posibles patógeno. La fermentación se utiliza a nivel mundial para el mantenimiento de una gama de materiales agrícolas sin procesar (cereales, raíces, tubérculos, frutas y hortalizas, leche, carne, pescado etc.).¹⁰

También se define a los probióticos como suplementos alimenticios que contienen microorganismos vivos cuyo efecto es beneficioso sobre quienes los consumen y aclaran que al no ser fármacos su finalidad es profiláctica o preventiva más que curativa.¹¹

De manera semejante también se determinan como microorganismos que renuevan el equilibrio microbiológico sobre todo a nivel de sistema digestivo lo que evitaría el desarrollo de enfermedades por colonización de patógenos, es por ello que los denominaron como agentes en pro o a favor de la vida y la salud.¹²

En el año 2002, la Food and Agricultural Organization (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los probióticos como productos que contienen microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto benéfico en la salud humana o animal. En suma, un agente probiótico ("para la vida"), puede ser definido como una formulación dietoterápica que contiene un número adecuado de micro-organismos vivos, los cuales poseen la capacidad de modificar la microbiota ejerciendo un efecto positivo y beneficioso para la salud.¹³

2.1.3. PROBIÓTICOS Y SALUD ORAL.

El cuerpo humano funciona como un sistema coordinado, así los problemas de salud general afectan a la salud de la boca y viceversa. Ante enfermedades consideradas complejas y multifactoriales (la vida moderna, el estrés, tabaco, malos hábitos

alimenticios, el consumo excesivo de medicamentos,) como son las de la boca, cada vez más, los enfoques son multidisciplinarios donde los abordajes son locales y sistémicos. Así las infecciones bucales crónicas en tejidos blandos provocan procesos inflamatorios liberando sustancias pro-inflamatorias como citoquinas, que a través del sistema circulatorio acceden a cualquier área del organismo aumentando el riesgo de problemas cardiovasculares, musculares, digestivos, partos prematuros, diabetes, lesiones deportivas. Por ello, la resolución de las enfermedades crónicas orales y el mantenimiento de la salud de la boca deben considerarse como un activo en la prevención de problemas sistémicos para la salud general.¹⁴

Los probióticos han sido ampliamente estudiados para la promoción de la salud, se desarrollaron para la prevención de las infecciones intestinales y en el tratamiento de la diarrea asociada al empleo de antibióticos, así como de la mala función intestinal, y se han establecido efectos positivos para su uso terapéutico en los últimos 100 años. Debido al hecho de que pueden competir con otras bacterias patógenas, han sido objeto de investigación en la prevención de las enfermedades bucodentales, puerta de entrada del sistema digestivo, como la caries dental, enfermedad periodontal, periimplantitis, mal-aliento... En términos generales, los probióticos promueven la salud mediante la exclusión competitiva o positiva de las bacterias patógenas.¹⁴ Los estudios en la utilización de probióticos en cavidad bucal, para el control y/o prevención de enfermedades infecciosas bucales en humanos, requieren bacterias con gran potencial de competir por el sitio, inhibiendo el crecimiento de los micro-organismos patógenos y permaneciendo en el sitio de la cavidad bucal, además de tener influencia positiva en la respuesta del sistema inmunológico.¹⁵

Actualmente existe un probiótico para uso odontológico que es un producto para la higiene bucal que combate la placa, la gingivitis y las bacterias cariogénicas mediante la combinación patentada de dos cepas de *Lactobacillus reuteri*. Es 100% natural, ya que reside en el tracto gastrointestinal en humanos y produce una sustancia antibiótica de amplio espectro llamada “reuterina”, que en suficiente cantidad causa el efecto antimicrobiano deseado para mantener la microbiota intestinal intacta. Su uso diario está recomendado tanto en niños como en adultos para una higiene bucal óptima, para personas que estén atravesando momentos de mucho estrés y agitación, o para quienes tengan un riesgo elevado de problemas periodontales como embarazadas, diabéticos,

fumadores o ancianos, y para personas que toman medicamentos que aumentan la sensibilidad de las encías como los anticonceptivos orales o los antihistamínicos.¹³

Las enfermedades bucales por su alta prevalencia e incidencia, y su influencia en la salud general del individuo, presentan unos rasgos generales que requieren de un enfoque preventivo. Nuevas maneras de pensamiento desarrollan estrategias dirigidas a potenciar un ambiente saludable de la boca para poder prevenir el desarrollo de infecciones oportunistas a través de emplear estrategias múltiples, entre ellas el uso de probióticos, con el fin de mantener el equilibrio ecológico de la bio-película. Los microorganismos probióticos pueden desarrollar un papel importante en la salud bucal, si son capaces de incorporarse a la película adquirida y crecer junto a la microbiota autóctona de la placa bacteriana o biofilm, a la vez que disminuyan la colonización de microorganismos patógenos, además de poder estimular una respuesta positiva del sistema inmunológico. Si bien son pocos los estudios disponibles sobre la acción de estos probióticos en la cavidad oral, los resultados son prometedores, e indican que éstos tendrían alguna efectividad clínica en la prevención de las enfermedades más comunes de la cavidad oral.^{13, 15}

2.1.4. MECANISMOS DE ACCION

De manera general, los probióticos promueven la salud alterando el balance ecológico mediante la exclusión competitiva de bacterias patógenas. Estudios *in vivo* e *in vitro*, utilizando diferentes cepas de *Lactobacillus*, han demostrado dicha competencia, mecanismo conocido como "inhibición competitiva". Los probióticos ejercen su acción a través de múltiples mecanismos, entre los cuales se destacan:

- promoción de la fagocitosis;
- inhibición del crecimiento bacteriano;
- modulación local de la respuesta inmune; e
- inhibición competitiva.¹⁶

El mecanismo de acción de los probióticos no está plenamente establecido, aunque en líneas generales se acepta que son capaces de mantener su viabilidad tras haber entrado en contacto con los ácidos gástricos, alcanzando y adhiriéndose a la mucosa intestinal, desde donde ejercen sus funciones compitiendo con los microorganismos patógenos y aumentando la inmunidad y resistencia a la infección por parte del huésped¹

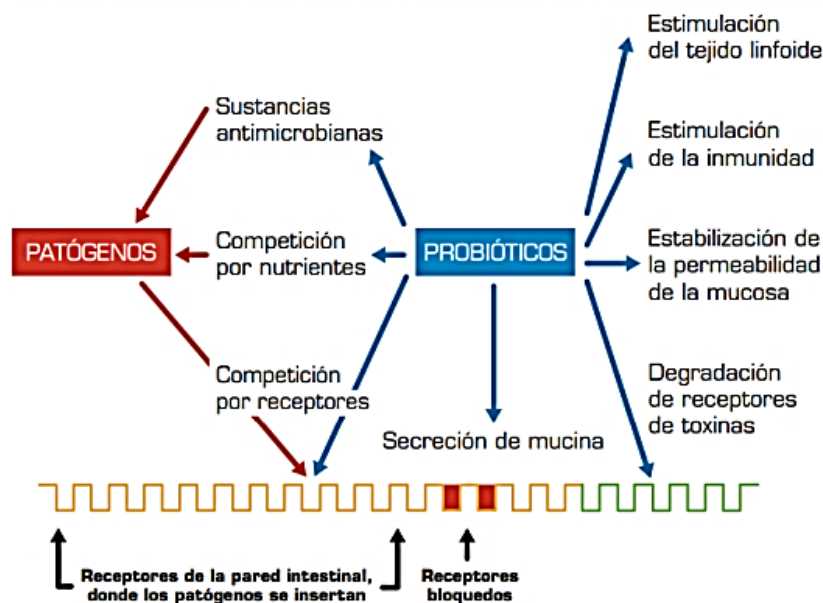


Figura N° 1: Mecanismo de acción de los probióticos.

Según Tormo, podemos resumir los mecanismos de acción de los probióticos en los siguientes

- Las bacterias probióticas son acidófilas, acidogénicas y acidúricas. Es decir, pueden desarrollarse en pH ácido, generar ácidos (generalmente ácido láctico) que impidan el crecimiento de gérmenes patógenos y seguir descendiendo el pH por debajo de 4, expresando su máxima eficiencia.
- Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* promueven la maduración del intestino y su integridad. Son antagónicos de patógenos y contribuyen a la modulación de la inmunidad intestinal.
- Ejercen influencia en la transferencia de plásmidos y en el establecimiento de trans conjugados en el intestino.
- Poseen la capacidad de adherirse a enterocitos y colonocitos y afectan a la composición del ecosistema intestinal, incrementando el efecto barrero no dependiente del sistema inmunológico.
- Desempeñan un efecto competitivo con otras bacterias, ocupando sus lugares de nidación e inhibiendo el crecimiento de especies enteropatógenas.
- Aumentan la expresión de las mucinas ileocolónicas coadyuvando al recubrimiento del intestino de una capa de moco, eficaz en la lucha antibacteriana.
- Compiten con nutrientes de la flora intestinal patógena. Dificultan la translocación bacteriana.

- Pueden influir y modular las respuestas inmunitarias, en parte mediadas por el tejido linfoide asociado al intestino.
- Son capaces de aumentar la producción de α -interferón por parte de linfocitos y macrófagos. Estimulan las células T *helper*, productoras de citoquinas y responsables de la inmunidad celular.¹⁷

2.1.5. CARACTERISTICAS

Los probióticos fomentan una buena salud por exclusión competitiva de los microorganismos dañinos, es decir estas bacterias poseen la propiedad de luchar por el sitio, evitando el desarrollo de las bacterias patógenas. Por otra parte (Rebolledo et al., 2013) mencionaron que los probióticos son microorganismos inofensivos lo que los hacen aptos y seguros para su consumo, pueden vivir por largos periodos de tiempo, incluso pueden resistir a condiciones ácidas, aunque no permanecen de forma fija, también poseen la capacidad de unirse a células epiteliales y pueden llegar a regular el sistema inmune, aumentando su capacidad para fabricar anticuerpos.⁵

(Ortega et al., 2002) relataron que la mayor parte de estos microorganismos son bacterias ácido lácticas, que ayudan a la conservación de alimentos por fermentación, así los encontramos en el yogurt, leches, quesos y también en presentación de cápsulas como microorganismos liofilizados. La fermentación reduce el pH, así se evita la inoculación por bacterias patógenas¹¹

Figura N° 2: Principales Características De Los Probióticos

PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS
- Seguridad total
- Inofensivo
- Resistencia a la acidez gástrica y secreciones pancreáticas
- Adhesión a células epiteliales
- Actividad antimicrobiana
- Inhibición de la adhesión de microorganismos patógenos
- Sensibilidad a los antibióticos
- Viabilidad alimentaria
- Cepas humanas
- Eficacia contrastada en ensayos clínicos

Fuente: (López Brea & Domingo, 2007). Antibioticoterapia con Probióticos. Revista Española de Quimioterapia. Págs. 170-181.

2.1.6. TIPOS DE PROBIÓTICOS

Las bacterias que se usan para enriquecer alimentos o para el uso como terapia interoceptica con fines de contrarrestar dolencias que son causadas por agentes patógenos. Por lo general, las bacterias empleadas como probióticos y que son exclusivamente bacterias ácido lácticas, pertenecientes a géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, mientras que en la *Tabla 2* se muestran los distintos géneros de bacterias que han sido utilizadas hasta el momento como probióticos.

Figura N°3: Bacterias Empleadas Como Probióticos¹⁸

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	Otros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>	<i>S. salivarius</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>oulardii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. longum</i>	<i>S. equinus</i>		<i>Propionibacterium</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. adolescentis</i>			<i>um.</i>
<i>L. caseiShirota</i>	<i>B. lactis</i>			<i>freudenreichii</i>
<i>L. rhamnosus GG</i>	<i>B. infantis</i>			<i>E. coli</i>
<i>L. johnsonii La 1</i>	<i>B. animalis</i>			<i>Lactococcuslactis</i>
<i>L. helveticus</i>				
<i>L. plantarum</i>				
<i>L. salivarius</i>				
<i>L. reuteri</i>				
<i>L. lactis LIA</i>				
<i>L. thermophilus</i>				
<i>L. gasseri</i>				
<i>L. crispatus</i>				

El género *Lactobacillus* pertenece al grupo de bacterias productoras de ácido láctico (BAL) a partir de los carbohidratos de la dieta, facilitando la fermentación de los alimentos. Son bacterias comensales muy comunes en el tracto digestivo de los mamíferos. Algunas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son residentes normales o que frecuentemente transitan por el aparato digestivo. *L. acidophilus* es la bacteria dominante en el intestino delgado, donde se hace la mayor parte de la digestión, mientras que *Bifidobacterium bifidum* reside en el intestino grueso donde se procesan los desechos para ser evacuados. *Bifidobacterium* es la bacteria anaeróbica predominante en el intestino delgado y juega un papel clave en el mantenimiento del equilibrio de la flora intestinal. En la cavidad oral el género *Bifidobacterium* prevalece en las lesiones de caries profundas y tiene un papel clave en la progresión de la caries al igual que el género *Lactobacillus*. Sin embargo, los lactobacilos están más asociados con la caries de dentina. A finales de 1980 una amplia gama de productos que contenían

especies del género *Bifidobacterium* fueron introducidos en el mercado en múltiples países, y diversos estudios validaron la supervivencia y los efectos positivos de *Bifidobacterium DN-173 010* dentro del tracto gastrointestinal. Como resultado de sus propiedades cariogénicas, el género *Lactobacillus* ha sido tema de gran interés en las investigaciones en el campo de la odontología durante varias décadas.¹⁹

2.1.7. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN

En la actualidad, la evidencia sugiere que los probióticos se pueden aplicar al control de la caries dental. En particular, los géneros de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, pueden ejercer efectos beneficiosos en la cavidad oral mediante la inhibición de *Streptococcus* y *Candida sp.* Los probióticos han sido probados en contra de miembros específicos de la microbiota, a menudo debido al papel central de estos microorganismos en la caries dental, los probióticos se pueden utilizar como una medida de auto-aplicación por vía oral proporcionados por los diferentes vehículos en una de las cuatro formas básicas:

- a. Concentrados añadidos a las bebidas (por ejemplo, el jugo de frutas),
- b. Inoculadas en fibra prebiótica que promueven el crecimiento de bacterias probióticas,
- c. Inoculadas en los alimentos lácteos o productos lácteos (por ejemplo, bebidas de leche, yogurt, queso) y
- d. Como células liofilizadas, secos envasados como suplementos dietéticos (comprimidos, masticar goma,).

El consumo diario de productos de yogurt y productos lácteos, parece ser la forma más natural de la ingestión de las bacterias probióticas, teniendo en cuenta los beneficios nutricionales de estos alimentos. La administración de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus* sugiere el descenso de los recuentos salivales de *Streptococcus mutans* (MS) y recientemente un estudio demostró *in vitro* la congregación *Lactobacillus/MS* especialmente de *Lactobacillus paracasei* y *L. rhamnosus*. Otro estudio muestra que cuatro cepas de *Lactobacillus*, comúnmente utilizados como probióticos, incluyendo *L. rhamnosus*, interfieren con la formación de biofilm con *S. mutans in vitro*. Más aún, un estudio clínico randomizado y controlado con 7 meses de seguimiento muestra una reducción de la incidencia de caries en un grupo de niños que consumieron leche con *L. rhamnosus*.²⁰

2.1.9 YOGUR ENRIQUECIDO CON CULTIVOS PROBIÓTICOS

Dentro de los alimentos con probióticos se encuentran los yogures los cuales al momento de su elaboración son agregados bacterias vivas que deben mantenerse estables y viables durante el almacenamiento del producto y en número suficientemente elevado que permita sobrevivir a las barreras defensivas naturales y al ecosistema del hospedador y que al ser ingeridas muestren efectos beneficiosos tanto en la prevención como en el tratamiento de desórdenes en el ecosistema estomatognático. El yogurt probiótico es básicamente cualquier yogurt con cultivos activos vivos, lo que significa que el yogurt más natural o artesano es un alimento probiótico. Contiene probióticos o bacterias de diversos tipos que se consideran beneficiosas para el cuerpo. Yogur probiótico es el más comercializado y consumido como digestivo y es perfectamente seguro para consumir la mayoría de la gente, como lo harían con el yogurt normal. En la elaboración los fabricantes de yogurt probiótico, agregan bacterias beneficiosas que seleccionan para sus productos tienen más probabilidad de sobrevivir a la digestión. Esto significa que puede ser más eficaz para ayudar a los males digestivos y para regularizar la digestión. Las empresas que fabrican estos yogures utilizan bacterias de marca registrada que no están disponibles en otros yogures, y creen que sus estudios justifican la superioridad al yogurt normal.²¹

2.1.10. RIESGOS EN EL CONSUMO DEL YOGUR ENRIQUESIDO CON PROBIOTICOS.

Desde un punto de vista teórico, al tratarse de microorganismos que normalmente forman parte de nuestra propia flora, difícilmente podrían causar problemas infecciosos, por lo que es muy baja la probabilidad de presentar efectos adversos por consumir probióticos. De las pocas personas que sí los han tenido, algunas sufrieron diarrea, y sólo unas cuantas que estaban muy enfermas o que tenían debilitado el sistema inmunitario contrajeron septicemia. Por otro lado, estos raros efectos secundarios no parecen tener relación con la cantidad de probióticos ingeridos. Algunas cápsulas de probióticos que se consiguen en las dietéticas contienen hasta 10.000 millones de microorganismos cada una, y se han realizado estudios con dosis de hasta 360.000 millones de bacterias sin que las personas presenten problemas.²²

Los probióticos o bacterias "amistosas" se consideran muy seguros como suplementos nutricionales. Las bacterias probióticas, como *L. acidophilus*, se han utilizado con éxito

para tratar docenas de dolencias comunes con muy poco riesgo de efectos secundarios, interacciones con medicamentos u otros resultados no deseados. Sin embargo, como todos los suplementos nutricionales, existen algunos riesgos al tomar grandes cantidades de probióticos y suplementos, lo cual puede no ser adecuado para todas las personas ocasionando problemas como: Problemas digestivos, Infección, Sobre estimulación, Cambios metabólicos, entre otros.²³

2.2. STREPTOCOCOS MUTANS

a. Generalidades

Los *Streptococcus* son cocos Gram positivos que se asocian en parejas y cadenas cortas o largas, dependiendo del producto patológico y del medio de cultivo; no tienen movimiento, no forman esporas. Carecen de catalasa y son anaerobios facultativos; cuando se desarrollan en presencia de aire, su crecimiento se ve favorecido por una atmósfera de 5-10 por 100 CO². La temperatura óptima de crecimiento es de 36 ±1°C. Su metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que descienden el pH, lo que obliga a utilizar medios amortiguados para evitar su muerte. Son catalasa y oxidasa negativos, propiedad que, junto con la tinción de Gram, diferencia los *Streptococcus* de las especies de *Neisseria*. Representan un amplio grupo de microorganismo: algunos forman parte de la microbiota normal, sin que se haya demostrado su patogenicidad; otros, por el contrario, se comportan como saprófitos, comensales e incluso como patógenos, produciendo diversas infecciones en los mamíferos.²⁴

b. Taxonomía.

La clasificación de los estreptococos se ha realizado basándose en diversos criterios, lo que ha motivado que exista una importante confusión en cuanto a su taxonomía y nomenclatura.

Figura N° 4: Criterios más importantes para la clasificación del Género *Streptococcus*.²⁵

Criterio	Fundamento
Tipo de hemólisis en Agar sangre	Distingue los estreptococos alfa, beta y gama hemolíticos.

Estructura antigénica	En función de los antígenos de grupo, es posible dividirlos estreptococos grupo específicos y no agrupables que carecen de dichos antígenos (sero grupos de Lancefield). Estos a su vez, pueden dividirse en serotipos en función de proteínas parietales superficiales o asociadas a ácidos lipoteicoicos y fimbrias. Por otro lado, los estreptococos no agrupables pueden dividirse en sero tipos en función de polisacáridos capsulares, parietales o proteínas superficiales.
Características fisiológicas	Mediante un número específico de pruebas convencionales se pueden relacionar estas características con determinados serogrupos.
Características nutricionales	Algunos dependen para su desarrollo de compuestos azufrados (dependientes de tiol).
Características genéticas y químicas estructurales	Se basan en estudios de proporciones de C+ Gen el ADN cromosómico, de homología ADN-ADN,ARN-ARN,ARN-ADN, y la secuencia deARNr (16S). También se fundamentan en el análisis de perfiles proteicos, de la estructura de la pared celular o de ácidos grasos.
Criterios clínicos	Diferenciación entre estreptococos piogénicos y no piogénicos.
<i>Streptococcus no viridans</i>	Habitualmenteβ-hemolíticos, diferenciables por los antígenos de los grupos de Lancefield. Tiene escaso interés en la cavidad oral.
<i>Streptococcus viridans</i>	Habitualmente no β-hemolíticos y difícilmente diferenciables por los sero grupos de Lancefield. A nivel ecológico y desde el punto de vista de su patogenicidad, los estreptococos <i>viridans</i> son los más importantes en la cavidad oral.

El género *Streptococcus*, que contiene los patógenos humanos más importantes, puede ser dividido operacionalmente en siete grupos, como se observa a continuación:

Figura5: Grupos de especies de *Streptococcus* sobre la base del análisis de secuencia de rRNA de subunidades pequeñas²⁶

Grupo	Nombre	Miembros	Hábitats
I	Grupo piógeno	<i>S. pyogenes</i> ; <i>S. agalactiae</i> ; <i>S. equisubspecie equi</i> ; <i>S. equisubspecie zooepidemicus</i> ; <i>S. dysgalactiaesubspecie dysgalactiae</i> ; <i>S. dysgalactiae subespecie equisimilis</i> ; <i>S. canis</i> ; <i>S. iniae</i> ; <i>S. porcinus</i> ; <i>S. phocae</i> ; <i>S. didelphis</i> ; <i>S. urinalis</i>	Seres Humanos Caballos, burros Muchos animales Cerdos, ganado bovino
II	Grupo <i>sanguis</i>	<i>S. parasanguis</i> (<i>S. paransanguinis</i>) <i>S. sinensis</i>	Seres Humanos

III	Grupo <i>mitis</i>	<i>S. mitis</i> <i>S. oralis</i> <i>S. crista (S. cristatus)</i> <i>S. peroris</i> <i>S. infantis</i> <i>S. australis</i> <i>S. oligofermentans</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. sanguis (S. sanguinis)</i> <i>S. sinensis</i>	Seres Humanos
IV	Grupo <i>mutans</i>	<i>S. mutans</i> <i>S. sobrinus</i> <i>S. cricetus</i> <i>S. downei</i> <i>S. rattus (S. rattii)</i> <i>S. macacae</i> <i>S. ferus</i>	Seres Humanos Seres Humanos Hámsters, ratas Monos Ratas Monos Ratas
V	Grupo <i>salivarius</i>	<i>S. salivarius</i> <i>S. vestibularis</i> <i>S. infantarius</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. hyointestinalis</i>	Seres Humanos Seres Humanos Seres Humanos Productos lácteos Hembras porcinas
VI	Grupo <i>anginosus</i>	<i>S. constellatus</i> , subespecies <i>S. anginosus</i> <i>S. intermedius</i>	Seres Humanos
VII	Grupo <i>bovis</i>	<i>S. bovis/S. equinus</i> <i>S. gallolyticus</i> subespecies <i>gallolyticus (S. bovis I)</i> <i>S. gallolyticus</i> subespecies <i>pasteurianus (S. bovis II.2)</i> <i>S. gallolyticus</i> subespecies <i>macedonicus</i> <i>S. infantarius</i> subespecies <i>infantarius (S. bovis II.1)</i> <i>S. infantarius</i> subespecies <i>coli</i> <i>S. alactolyticus</i> <i>S. suis</i>	Ganado bovino, caballos Humanos, koalas, osos Seres Humanos Ambiental (quesos) Seres Humanos, ganado Seres Humanos Cerdos, Perros, Pollos Cerdos, Ganado, Humanos
	Otros	<i>S.uberis/S.parauberis</i> <i>S. hyointestinalis</i> <i>S. hyovaginalis</i> <i>S. thoralensis</i> <i>S. pluranimalium</i> <i>S. enteriticus</i> <i>S. ovis</i> <i>S. gallinaceus</i> <i>S.minor</i>	Ganado bovino Cerdos Ganadobovino, ovejas Ganado bovino Ganadobovino Ovejas Pollos Perros, Gatos, Ganado

c. *Streptococcus mutans.*

Es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa dental o biofilm dental, el cual es uno de los principales microorganismos cariogénicos asociados a la caries dental. De

acuerdo con la hipótesis de la placa ecológica, la caries dental es la consecuencia de cambios en el balance natural de la microflora de la placa dental causados por la alteración de las condiciones ambientales locales (homeostasis microbiana oral). El estudio de su participación en la colonización de tejidos dentales, implantación e interacción con otros microorganismos es de mucha importancia para la comprensión de la dinámica de las biopelículas dentales. De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente. Se describe la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad. Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biofilm o biopelícula) con todas sus funciones, interacciones y propiedades. *Streptococcus mutans* (S. mutans) es el agente más importante asociado a ella. La caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral.²⁷

Clasificación de *Streptococcus mutans* Con base en la composición y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, estreptococos del grupo mutans se pueden clasificar en 8serotipos:

- a. *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k),
- b. *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g),
- c. *Streptococcus cricetus* (serotipo a),
- d. *Streptococcus rattus* (serotipo b),
- e. *Streptococcus ferus* (serotipo c),
- f. *Streptococcus macacae* (serotipo c) y
- g. *Streptococcus downei* (serotipo h).

Se sabe que el serotipo “c” de S mutans es el tipo predominante en la cavidad oral humana más que las cepas e, d, y k.²⁸

d. Transmisión, Colonización y estabilidad de *Streptococcus mutans* en cavidad oral

La caries dental es una enfermedad dental transmisible en la cual los estreptococos del

grupo mutans juegan un papel principal. Como en muchas enfermedades infecciosas, se requiere la colonización de un patógeno antes de que ocurra la infección. Hay un rango de factores de virulencia importante para el establecimiento de *Streptococcus mutans* en la compleja comunidad microbiana de la biopelícula dental. Estudiar los factores de virulencia de *S. mutans* y su correlación con la biodiversidad de especies es fundamental para entender el papel que juega en la colonización por los diferentes genotipos en el mismo individuo la expresión de las características que puedan o no influenciar su capacidad de virulencia y su habilidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales.²⁶

El papel de los *Streptococcus* del grupo mutans, especialmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en la etiología de la caries dental ha sido extensamente investigado y claramente demostrado. La evidencia indica que una forma importante de transmisión de *S. mutans* durante los primeros años de vida es la que se produce de madre a hijo por contacto directo (transmisión vertical), mientras que el contacto con otros familiares, incluidos el padre, los hermanos y demás posibles cuidadores constituye otra vía de transmisión (transmisión horizontal) que cobra importancia durante edades posteriores. Este fenómeno es conocido como persistencia “intra individual” y revela la relativa estabilidad que estos alcanzan en un hospedador y la relación con la expresión de características fenotípicas que les pueden dar ventajas para la supervivencia, como la capacidad de formar biopelículas, de adherirse y soportar fluctuaciones del pH. Se ha considerado comúnmente que la colonización de la cavidad oral de los niños por *S. mutans* (“ventana” de infección) ocurre al producirse la erupción del primer diente, es decir, alrededor de los seis meses de edad. Sin embargo, es lógico pensar que en niños expuestos a factores que facilitan los procesos de transmisión, la colonización se produzca antes de la aparición de los primeros dientes.²⁷

Hay dos factores que sugieren que *S. mutans* pueda aparecer durante la etapa presentar:

- 1) *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son capaces de colonizar superficies mucosas.
- 2) Algunos niños desarrollan lesiones de caries poco después de la erupción dental. La colonización temprana de la cavidad oral (antes de la erupción dental) por *S. mutans* puede aumentar el riesgo de caries y hacer que su desarrollo se produzca a edades más tempranas.²⁷

e. Factores De Virulencia.

- **Acidogenicidad:** El *S. mutans* puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.
- **Aciduricidad:** Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
- **Acidofilicidad:** El *S. mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones de (H)⁺ fuera de la célula, esta condición hace que el microorganismo cambie su fisiología
- **Síntesis de fructanos y glucanos:** por medio de enzimas como glucosil fructosil transferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucanos y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente ser usados como reserva de nutrientes.
- **Síntesis de polisacáridos intracelulares:** la célula almacena glucógenos que ante la falta de ingreso de azúcares por vía exógena con la dieta puede metabolizarse por la acción de la aglucogeno fosforilasa. Ante un incremento de productos intermediarios de la glucólisis.
- **Producción de dextranasa:** además de movilizar reservas de energía esta enzima puede regular la actividad de las glucosil transferasas removiendo productos finales de glucano. La infección ocurre generalmente por miembros de la familia especialmente por la madre.
- **Adhesinas:** presenta adhesinas de superficie de la familia de adhesinas Spa también llamada antígeno I / II participan en el proceso de adherencia a las glicoproteínas salivales y a otros microorganismos.
- **Proteínas asociadas a la pared celular:** le permiten adherirse a las caras libres de las piezas dentarias y participar en la adherencia dependiente de la sacarosa, pero su papel en la cariogénesis no es claro.²⁹

2.3. HIPOTESIS

Ho: El yogur con cepas probióticas **Si** poseen un efecto inhibitorio significativo ante la proliferación y crecimiento del *Streptococcus mutans* bucal in vitro.

Hi: El yogur con cepas probióticas **No** poseen un efecto inhibitorio significativo ante la proliferación y crecimiento del *Streptococcus mutans* bucal in vitro.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACION

TIPO DE INVESTIGACION:

- De acuerdo al análisis y alcance de los resultados: **Tipo Experimental;** Donde existe intervención por parte de nosotros y los datos no revelan la evolución natural de los eventos.
- Según el tiempo de ocurrencia de los hechos y registros del estudio: **Prospectivo;** Donde los datos que recogimos fueron a propósito de la investigación
- Según el periodo y secuencia del estudio: **longitudinal;** donde Las variables de estudio fueron medidas dos ocasiones.

DISEÑO DE INVESTIGACION:

- **Explicativo:** Se Investigó los orígenes de problema, estableciendo relaciones de causa - efecto entre la variable independiente y la variable dependiente.

3.2. POBLACION Y MUESTRA

POBLACIÓN

- Cepas de *Streptococcus Mutan* bucal.

MUESTRA

- Concordante al de tipo probabilístico, porque todas las muestras tienen la probabilidad de ser incluidas en la investigación.

TAMAÑO DE MUESTRA

FORMULA PARA TAMAÑO DE MUESTRA

$$n = 2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 (DE)^2 / d^2$$

Se usó la fórmula para comparar dos o más medias:

- n : Tamaño de cada grupo de estudio
- α : Probabilidad de cometer error tipo I
- β : Probabilidad de cometer error tipo II
- Z : Valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error
- DE : Desviación estándar
- d : Diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias

Considerando los requerimientos de una confianza del 99% ($\alpha = 0.05$, $Z = 2.57$) y una potencia en la prueba del 80% ($\beta = 0.20$, $Z = 0.84$), para ($DE/d = 0.50$)

$$n = 2(2.57 + 0.84)^2 (0.5)^2$$

$$n = 5.8$$

$$n = 6$$

Por ende, determinamos que cada placa Petri contendrá de 6 repeticiones; Tomando 10 placas petri para cada Grupo Experimental se obtuvo un total de 60 aplicaciones para cada grupo experimental y 180 aplicaciones para todo el experimento.

3.3. GRUPOS DE ESTUDIO

a) Diseño de los Grupos experimentales:

- Grupo experimental 1 (GE₁): Cultivos de *Streptococcus mutans* bucal Sometidas con Yogur N° 1 Contenidas de Cepas Probioticas (yogur de producción nacional)
- Grupo experimental 2 (GE₂): Cultivos de *Streptococcus mutans* bucal Sometidas con Yogur N° 2 Contenidas de Cepas Probioticas (yogur de producción local)
- Grupo control (GE₃) Cultivos de *Streptococcus Mutan* bucal Sometidas con Yogur común (yogur de producción alcance nacional.)

b) Criterios de selección de muestra:

Criterios de inclusión.

- Placas con siembra adecuada de *Streptococcus mutans* bucal.
- Placas que después del proceso de incubación presentaron halos de inhibición.

Criterios de exclusión.

- Placas que después del proceso de incubación no mostraron halos de inhibición.

3.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

a. Variable independiente:

- Yogur con Cepas probioticas

b. Variable dependiente:

- Efecto Inhibitorio Frente a la proliferación del *Streptococcus mutans*.

Figura N° 6: TABLA DE OPERACIONALIZACION DE VARIABLES.

Variable	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores	Naturaleza de la variable	Escala de medición
(Variable independiente) Yogur con Cepas probioticas	Yogur que contiene Microorganismos vivos que, suministrados adecuadamente promueven beneficios en la salud.	Capacidad de inhibir la proliferación del <i>Streptococcus mutans</i>	Yogur con cepas probioticas de acuerdo a la procedencia; Nacional y Local	Cualitativa / nominal	Si inhibe. No inhibe.
(Variable dependiente) Efecto Inhibitorio Frente a la proliferación del <i>Streptococcus Mutans</i> .	Capacidad de una sustancia química natural o sintetizada que es capaz de inhibir la proliferación del <i>Streptococcus mutans</i> .	Concentración y susceptibilidad bacteriana a las 24 y 48 horas.	Halos de inhibición del crecimiento bacteriano a las 24 y 48 horas.	Cuantitativa / ordinal.	De razón a: Tamaño en (mm) del halo de inhibición .

Fuente: elaboración propia de los autores.

3.5. TECNICA E INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

3.5.1. INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCION DE DATOS.

- **Ficha N° 1:** FICHA DE RECOLECCION DE DATOS.
- **Ficha N° 2:** FICHA MATRIZ DE DATOS.

3.5.2. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCION DE DATOS.

Para realizar la recolección de datos se utilizó la técnica de la observación directa tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión, cumpliendo estrictamente las medidas de seguridad e indicaciones y de nuestro asesor de laboratorio que controla todos procedimientos, y como también bajo las indicaciones y observación sugeridas de nuestro asesor de tesis; de tal manera que no se desarrolle algún tipo de contaminación cruzada que interfiera en nuestros resultados.

3.5.3. RECURSOS Y MATERIALES

RECURSOS HUMANOS.

- Director de tesis : CD. Cesar Augusto Molina delgado
- Asesor de laboratorio : Lic. Lorgio Balbino Palacios Frisancho.
- Jurados : Dr. Jorge Luis Mercado Portal (Presidente)
CD. Betzy Quispe Quispe (Primer miembro)
CD. Nelly B. Quispe Maquera (Segundo miembro)
- Tesistas : Bach. Claudia Ligue Cati
Bach. Edwin Rene Quispe Roncalla

RECURSOS INSTITUCIONALES.

- Universidad nacional del altiplano puno.
- Laboratorio de microbiología de la facultad ciencias biológicas de la UNAP.
- Clínica odontológica de la escuela profesional de odontología de la UNAP.

3.5.4. INSTRUMENTAL Y MATERIALES DE LABORATORIO MICROBIOLÓGICO

- Medios de cultivo:
 - i. Agar Mueller Hinton.
 - ii. Agar sangre.
- Jarra Microbiológica de Anaerobios.
- Placas Petri

- Pliegos de papel kraft
- Pabilos
- Cinta de masking tape.
- Autoclave (horno a presión de calor húmedo).
- Microscopio Óptico Compuesto con objetivo de inmersión
- Estufa de Incubadora Microbiológica.
- Matraz
- Tubos de ensayo
- Mechero Bunsen
- Hisopos estériles
- Bandeja porta objetos
- Placa milimetrada de recuento de colonias
- Regla metálica milimetrada para medir espacios
- Safranina, alcohol cetona, lugol y violeta de genciana.
- Solución peptonada.
- Solución para medio de transporte.
- Agua destilada y suero fisiológico.
- Cocina eléctrica
- Jeringas desechables de 5 ml. y tuberculina.
- Reactivos:
 - i. Agua destilada
 - ii. Alcohol al 96%
 - iii. Solución fisiológica al 0.9%
 - iv. Ampollas de agua destilada de 5ml.

3.5.5. ELEMENTOS AUXILIARES DE REGISTRO Y PROCESAMIENTO DE DATOS

- Cámara fotográfica digital.
- Equipo de procesamiento de datos (laptop core i3)
- Vernier digital
- Materiales de escritorio: papel, lápiz, lapiceros, marcador indeleble, rotuladores, entre otros.

3.5.6. INSTRUMENTAL Y MATERIALES DE USO ODONTOLÓGICO

Instrumental y materiales que se usó exclusivamente para la toma de muestras de tejido dentario cariado.

- Equipo básico de abordaje: explorador bucal, pinzas porta algodón, espejos bucales,
- Curetas maillefer
- Algodón y gasas.

3.5.7. ELEMENTOS DE BIOSEGURIDAD

- Guantes quirúrgicos estériles
- Mascarilla desechable
- Anteojos transparentes
- Detergente, desinfectantes y jabón carbólico.
- Escobilla para lavado de manos.
- Mandil color blanco
- Gorra color blanco

3.6 DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA

3.6.1 Obtención del yogur con cepas probióticas

- Para el yogur N° 1 correspondiente al yogur de producción nacional, a las grandes entidades comerciales, realizando una selección obtuvimos yogur natural con un mayor número de cepas probióticas sin edulcorantes ni saborizantes, los cuales cumplen con el requerimiento solicitado para el presente proyecto de investigación in vitro;
- Para el yogur N° 2 Correspondiente al yogur de producción local nos apersonamos a una planta de producción de yogur solicitando que elabore yogur natural sin edulcorantes ni saborizantes.

3.6.2 Obtención del yogur sin cepas probióticas.

- Para el yogur sin cepas probióticas nos apersonamos a los kioscos donde se expenden yogur común de consumo cotidiano el cual es de elaboración y alcance nacional.

3.6.3 Preparación De Las Muestra De Experimentación.

a. Preparación Del Medio De Cultivo

La preparación de los medios de cultivo comprende los siguientes tiempos fundamentales:

- Pesamos adecuadamente de los ingredientes y disolución con calor.
- Agregamos las sustancias de sostén: Agar-Agar,
- Luego realizamos el ajuste del pH. Por lo general las bacterias exigen una reacción neutra o ligeramente alcalina pH 6,8 - 7,2. Un pH alto o bajo retarda o inhibe el crecimiento de las bacterias.

Para determinar el pH, se ha empleado los siguientes métodos:

- Método del papel indicador universal de pH
- Método colorimétrico

b. Preparación de agar sangre

Para el procedimiento realizamos lo siguiente:

- Colocamos en Baño María un frasco o balón con 100 ml de Agar nutritivo estéril hasta que licué completamente.
- Luego dejamos enfriar hasta 45 - 50°C.
- A la cual se le añadió asépticamente sangre (humana) en proporción del 5-8%.
- Agitamos suavemente para homogenizar la solución.
- Luego lo repartimos equitativamente en placas Petri en un número de 30.
- El color de este medio es rojo – cereza el cual almacenamos bajo estrictos controles de temperatura y esterilidad hasta el momento de la siembra

c. Obtención del *Streptococcus mutans* bucal.

Para la obtención de cepas del *Streptococcus mutan* bucal realizamos lo siguiente los cuales acorde a las explicaciones e indicaciones de nuestro asesor de laboratorio:

- Previa solicitud y aprobación para la toma de muestras de tejido dentario cariado en la Clínica Odontológica De La Universidad

Nacional Del Altiplano – Puno, nos preparamos para la toma y transporte de muestra.

- Preparamos 4 tubos ensayo con solución peptonada (caldo agar nutritivo) en una cantidad de 3 ml.
- Bajo la supervisión del coordinador de la clínica abordamos 4 pacientes de los cuales tomamos las muestras de tejido dental cariado en cada tubo de ensayo previamente rotulado.
- El transporte de las muestras se realizó cuidadosamente sometiéndonos a medidas de esterilidad los cuales inmediatamente se llevó a la incubadora por 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se realizó la siembra en Agar sangre.
- Luego de la identificación se aisló y se hizo una resiembra un medio selectivo para *Streptococcus mutans* bucal colocándolos en una campana de anaerobiosis para ser cultivadas por 24 horas a 37°C.
- La identificación de colonias de *Streptococcus mutans*, se realizó en base a la observación de la morfología colonial y la adherencia de la colonia al agar.
- Luego se hizo el diagnóstico microscópico a través de frotis y tinción de Gram de una muestra de la colonia aislada. Para confirmar la identificación plena del *Streptococcus mutans* se complementó con pruebas bioquímicas

d. Preparación del inóculo por el Método de KirbyBauher

El inóculo del *Streptococcus mutans*, fue preparado en un tubo de ensayo, suspendiendo las colonias puras aisladas en 0.5 ml de suero fisiológico hasta obtener una turbidez de 0.5 de Mac Farland, que corresponde a una concentración de 1.5×10^2 alfa unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* por 1ml (UFC/ml)

e. Siembra

Se realizó la siembra por Trasplante. Que significa que la siembra se realiza de una muestra líquida a un medio sólido. El material contiene una sola especie bacteriana, y se realizó con la finalidad de conservar el microorganismo renovando su medio de cultivo

para conocer sus propiedades biológicas y bioquímicas.

Procedimiento:

- Esterilizar el asa por flameado.
- Dejarla enfriar.
- Se tomó con la mano izquierda el tubo con la muestra se le dio leve inclinación para evitar, contaminación con microorganismo del medio ambiente, al ser destapado.
- Con la mano derecha, se sostuvo el asa y ayudado con el dedo meñique de esta misma mano, se sacó la lámina metálica del tubo con la cepa.
- Flamear la boca del tubo, e introducir el asa sin tocar las paredes y cargarla con la suspensión o cepa. Retirar el asa.
- Flamear de nuevo la boca del tubo, y tapar con la lámina metálica.
- Inmediatamente tomar con la mano izquierda el tubo con el medio de cultivo sólido estéril, destapar con cuidado de esterilidad e introducir el asa hasta el fondo, y apoyando la aguja sobre la superficie, hacer una línea o estría sin romper el medio de cultivo.
- Flamear la boca del tubo y el asa de Kolle.
- Rotular la Placa, con el nombre y fecha
- Incubar en la estufa a 37°C por 24 a 48 horas.
- Transcurrido el tiempo se realiza la observación:

f. Diseño de los grupos de experimentación

- Para el grupo experimental N° 1 Se consideró las cepas probióticas contenidas en el yogur N° 1 de elaboración nacional, el tiempo de crecimiento y el halo de inhibición en mm.
- Para el grupo experimental N° 2 Se consideró las cepas probióticas contenidas en el yogur N° 2 de elaboración local, el tiempo de crecimiento y el halo de inhibición en mm.
- Para el grupo control se empleó el yogur común de elaboración local donde se consideró el tiempo de crecimiento y el halo de inhibición en mm.

g. Fase experimental

Inoculación del yogur con cepas probióticas

Para el **grupo experimental N° 1** se tomó 10 placas Petri en los cuales se realizó los pocillos en un número de 6 repeticiones por placa para luego introducir en cada una de ellas un disco de antibiograma estéril, consiguientemente se aplicó con una pipeta automática el tratamiento con cepas probióticas contenidas en el yogur N° 1 sobre los discos de antibiograma, todo ello bajo las estrictas medidas de seguridad y esterilidad a fin de evitar cualquier contaminación cruzada durante el procedimiento, luego se llevó a incubar la totalidad de las muestras a una temperatura de 36°C por 24 y 48 horas.

Para el **grupo experimental N° 2** se tomó 10 placas Petri en los cuales se realizó los pocillos en un número de 6 repeticiones por placa para luego introducir en cada una de ellas un disco de antibiograma estéril, consiguientemente se aplicó con una pipeta automática el tratamiento con cepas probióticas contenidas en el yogur N° 2 sobre los discos de antibiograma, todo ello bajo las estrictas medidas de seguridad y esterilidad a fin de evitar cualquier contaminación cruzada durante el procedimiento, luego se llevó a incubar la totalidad de las muestras a una temperatura de 36°C por 24 y 48 horas.

Inoculación del yogur sin cepas probióticas del grupo control

Para el **grupo control**; se tomó las 10 placas petri restantes se realizó los pocillos en un número de 6 repeticiones por placa para luego introducir en cada una de ellas un disco de antibiograma estéril, consiguientemente se aplicó con una pipeta automática el tratamiento con cepas probióticas contenidas del yogur común, sobre los discos de antibiograma, todo ello bajo las estrictas medidas de seguridad y esterilidad a fin de evitar cualquier contaminación cruzada durante el procedimiento, luego se llevó a incubar la totalidad de las muestras a una temperatura de 36°C por 24 y 48 horas.

h. Métodos realizados para la medición de los halos de inhibición.

Para la precisión del recuento y medición de los halos de inhibición se tomó en cuenta la totalidad de los 6 pocillos con tratamiento desarrolladas en las placas Petri realizando lo siguiente:

- Efectuamos las mediciones del diámetro del halo de inhibición en milímetros. Con una regla milimetrada y vernier digital, para una mejor precisión.

- Luego los sumamos el número las medidas del halo de inhibición de los 6 pocillos por placa para sacar los promedios respectivos.
- Los resultados anotamos en nuestra ficha de datos

i. Lectura e interpretación de los resultados.

Para la lectura e interpretación se decidió no tomar a las bacterias como individuos si como agregados o colonias que son formados por un gran número de células bacterianas de tal manera que nos resultó más práctico y efectivo. El recuento de microorganismos que se multiplicaron en el medio de cultivo se hizo por métodos físicos: Turbidez (Escala de Mac Farland) y biológicos como en la siembra por dilución y medición del diámetro del halo de Inhibición desarrollada.

3.7 CONSIDERACIONES ÉTICAS

- a) Una vez presentado nuestro proyecto de investigación se nos aprobó y otorgo el acta de aprobación. (ANEXO N°1)
- b) Se solicitó la autorización para obtención de muestras de tejido dental cariado de paciente que se atienden en la Clínica Odontológica (ANEXO N°2)
- c) Se solicitó la autorización para el uso y ejecución del proyecto de investigación de los laboratorios de microbiología de la Facultad Ciencias Biológicas De La Universidad Nacional Del Altiplano Puno. (ANEXO N°3)

3.8 DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para interpretación de los resultados que se obtuvieron del presente estudio experimental se utilizaron:

- Pruebas estadísticas inferenciales prueba t o Test-T para determinar la capacidad de inhibición del yogur con cepas probióticas frente a la proliferación del Streptococcus mutans bucal, con lo cual corroboramos nuestra hipótesis.
- Se realizó la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) para contrastar muestra hipótesis, y determinar la significancia.
- Se empleó la prueba de Tukey para comparar las capacidades de inhibición del yogur N° 1 frente al yogur N° 2 contenidas de cepas probióticas para establecer diferencias significativas.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

TABLA N° 1.

CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL *Streptococcus mutans* A LAS 24 Y 48 HORAS.

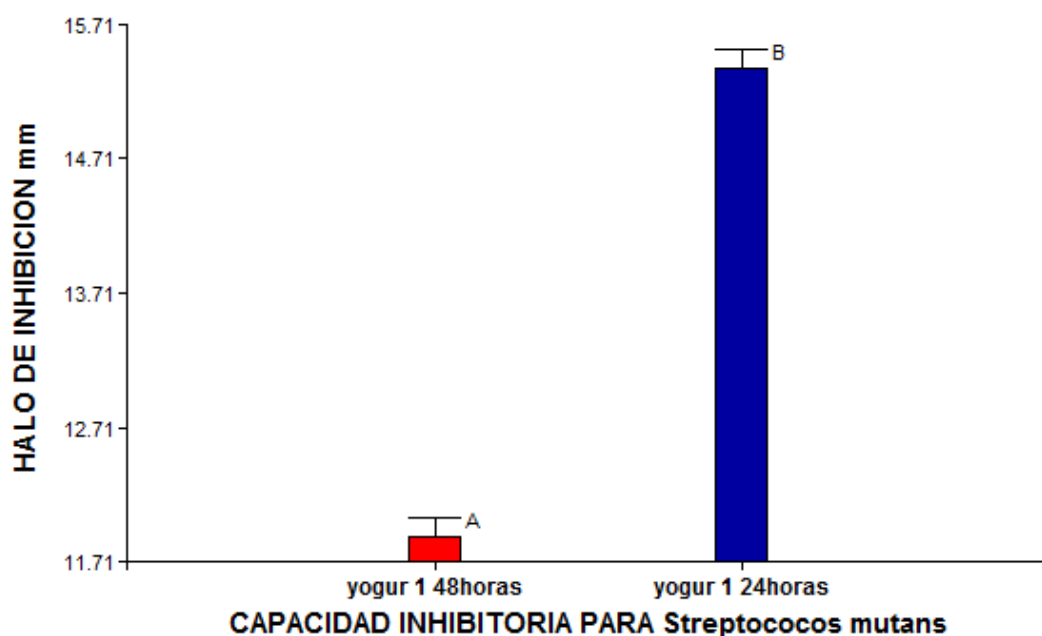
PRUEBA DE t PARA EL ANALISIS DE DATOS DE LOS PROMEDIOS DEL HALO DE INHIBICION	CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i>			
	G1		GRUPO CONTROL	
	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
PROMEDIO	15.39 mm	11.89 mm	0	0
D.E	± 0.42	± 0.45	0	0
LI	15.11 mm	11.57 mm	0	0
LS	15.67 mm	12.21 mm	0	0
T_{calculada}	121.80	83.65	0	0
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Fuente: *Elaboración Propia De Los Autores.*

Interpretación: Los promedios de la capacidad inhibitoria de yogur 1 se sometió al análisis estadístico de t para observar la frecuencia de la zona de inhibición en mm frente a la bacteria *Streptococcus mutans*, en relación al promedio de las 6 repeticiones por placa, obteniéndose que el promedio de halo de inhibición es de 15.39 mm en las 24 horas, para las 48 horas el promedio es 11.89 mm siendo la diferencia de 3.5 mm, por lo que a mayor tiempo de incubación menor capacidad inhibitoria. resultando la Desviación Estándar (D:E) de ± 0.42 para un tiempo de incubación de 24 horas y a las 48 horas de ± 0.45, el límite inferior (LI) de 15.11 mm y límite superior (LS) de 15.67 mm para las 24 horas y para las 48 horas es de 11.57 mm LI y 12.21 mm LS, con la prueba de t calculado para las 24 horas es de 121.80 y para las 48 horas de 83.65 con una probabilidad de $P \leq 0.0001$, en tal sentido existe una distribución normal y homogéneo en los resultados de los promedios en las diferentes placas con 6 repeticiones, por lo tanto no existe diferencia en la distribución, por lo mismo que la frecuencia de halo de inhibición son iguales, tal como se observa en la tabla 1. En comparación al grupo control podemos determinar que esta no tiene un efecto inhibitorio en relación al yogur con cepas probióticas.

Interpretación estadística: En el análisis Estadístico observado entre la zona de inhibición del yogur 1 en la proliferación de bacteria *Streptococcus mutans* fue marcadamente diferente entre la zona de inhibición a las 24 horas en relación a las 48 horas, lo que demuestra que el mejor comportamiento en la capacidad inhibitorio con las cepas probióticas del yogur 1 es a las 24 horas, todos estos presentan asociación debido a que los resultados de la prueba de Tukey resultó significativa (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41874), en tal sentido existe relación entre las variables (tiempo de incubación y el halo de inhibición de *Streptococcus mutans*), siendo la relación al azar.

GRAFICO N° 1



Contraste de Tukey ($gl=18$, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 1 en tiempos de 24 y 48 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*.

TABLA N° 2

CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas.

PRUEBA DE t PARA EL ANALISIS DE DATOS DE LOS PROMEDIOS DEL HALO DE INHIBICION	CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i>			
	G2		GRUPO CONTROL	
	24 HORAS	48 HORAS	24 HORAS	48 HORAS
PROMEDIO	12.64	11.81	0	0
D.E	± 0.44	± 0.44	0	0
LI	12.32 mm	11.50 mm	0	0
LS	12.95 mm	12.12 mm	0	0
T_{calculada}	91.14	85.56	0	0
P	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

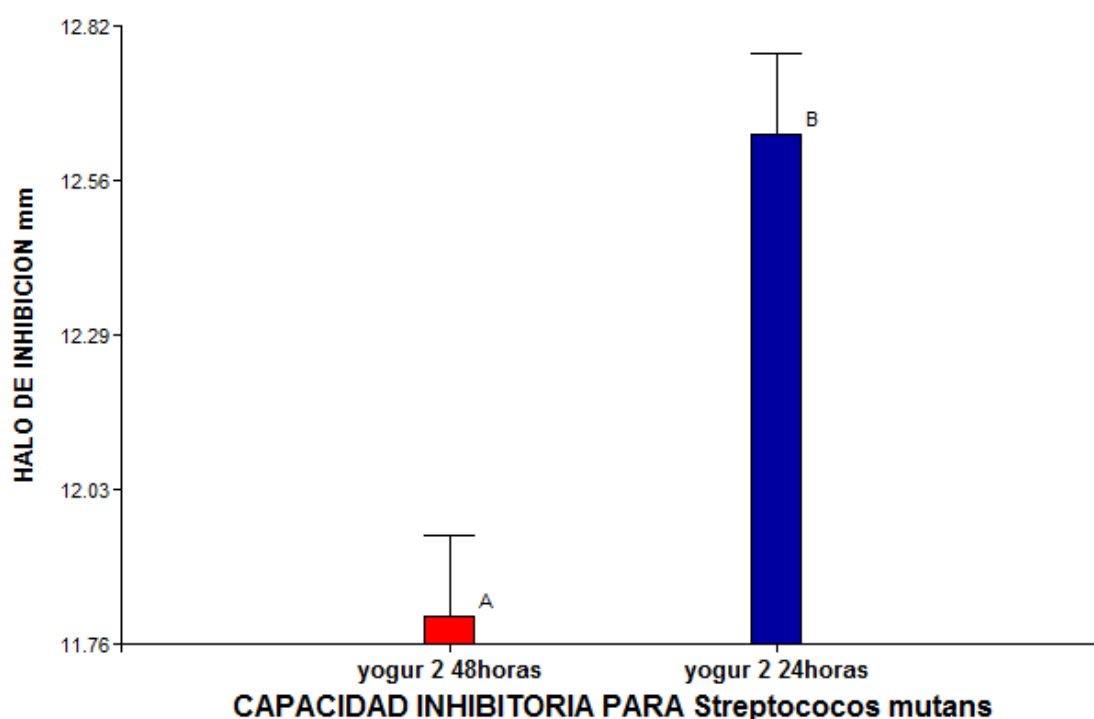
Fuente: *Elaboración propia de los Autores*

Interpretación: En el análisis de datos de los promedios obtenidos de la capacidad inhibitoria de yogur 2 se sometió a la prueba estadística de t para observar la frecuencia de la zona de inhibición en mm a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*, en relación al promedio de las 6 repeticiones por placa, obteniéndose que el promedio de halo de inhibición es de 12.64 mm en las 24 horas, para las 48 horas el promedio es 11.81 mm siendo la diferencia de 0.83 mm, por lo que a mayor tiempo de incubación menor capacidad inhibitoria. resultando la Desviación Estándar (D:E) de ± 0.44 para un tiempo de incubación de 24 horas y 48 horas respectivamente, el límite inferior (LI) de 12.32 mm y límite superior (LS) de 12.95 mm para las 24 horas y para las 48 horas es de 11.50 mm LI y 12.12 mm LS, con la prueba de t calculado para las 24 horas es de 91.14 y para las 48 horas de 85.56 con una probabilidad de $P \leq 0.0001$, en tal sentido existe una distribución normal y homogéneo en los resultados de los promedios en las diferentes placas con 6 repeticiones, por lo tanto no existe diferencia en la distribución, por lo que la frecuencia de halo de inhibición son iguales, tal como se observa en la tabla 2. En comparación al grupo control podemos determinar que esta no tiene un efecto inhibitorio en relación al yogur con cepas probióticas.

Interpretación estadística: En el análisis Estadístico observado entre la zona de inhibición del yogur 2 en la proliferación de bacteria *Streptococcus mutans* fue marcadamente diferente entre la zona de inhibición a las 24 horas en relación a las 48

horas, lo que demuestra que el mejor comportamiento en la capacidad inhibitorio con las cepas prebióticas del yogur 1 es a las 24 horas, todos estos presentan asociación debido a que los resultados de la prueba de Tukey resultó significativa (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41103), en tal sentido existe relación entre las variables (tiempo de incubación y el halo de inhibición de *Streptococcus mutans*), siendo la relación al azar.

GRAFICO N° 2



Contraste de Tukey (gl=18, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 2 en tiempos de 24 y 48 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*.

TABLA N° 3

COMPARACION DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL *Streptococcus mutans* a las 24 HORAS.

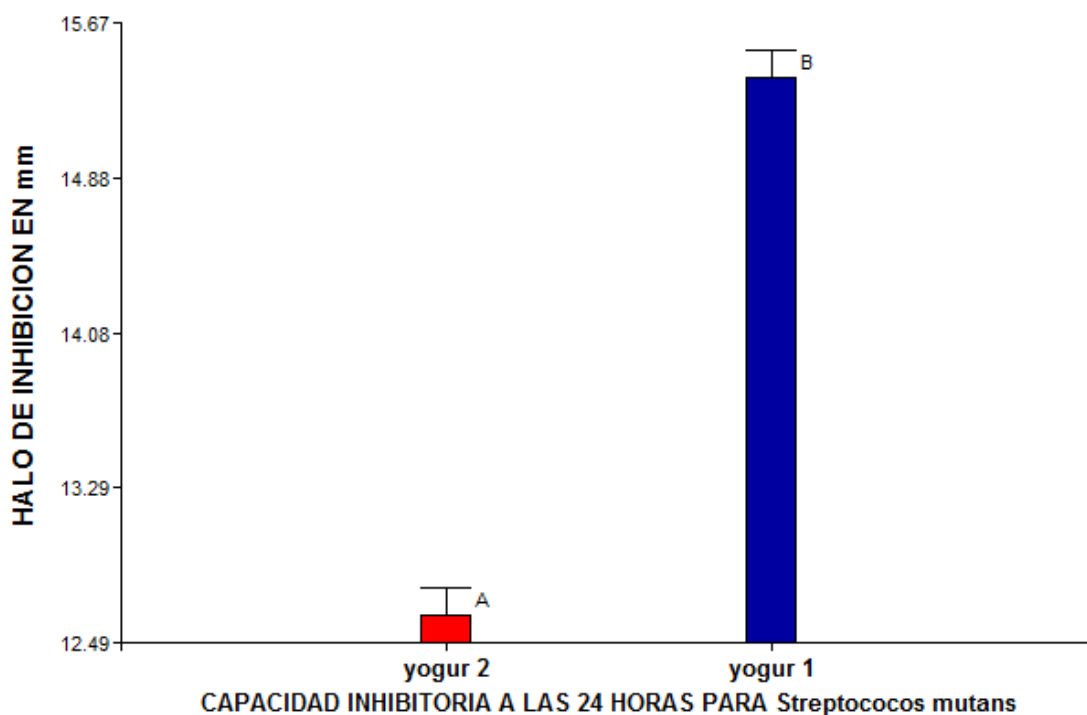
TRATAMIENTO EN LA PROLIFERACION DE LA BACTERIA <i>Streptococcus mutans</i> EN LAS PLACAS PETRY	COMPARACION INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON EL YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i> A LAS 24 HORAS	
	PROMEDIOS YOGUR 1	PROMEDIOS YOGUR 2
PROMEDIO	15.39 mm	12.64 mm

Fuente: *Elaboración Propia De Los Autores*

Interpretación: En la tabla 3, Utilizando el método de Kirby Bauer para determinar el halo de inhibición, se puede observar que la relación entre el efecto inhibidor producido por yogur 1 y yogur 2 a las 24 horas frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*, en la observación in vitro, los resultados del promedio del mayor halo de inhibición se registra en el yogur 1 con 15.39 mm, el menor promedio del halo de inhibición se da en el yogur 2 con 12.64 mm, por ultimo podemos mencionar que entre el mayor halo de inhibición con el menor halo de inhibición la diferencia es de 2.75 mm en favor al yogur 1.

Interpretación estadística: En el análisis Estadístico observado entre la zona de inhibición de yogur 1 con el yogur 2 a las 24 horas en la proliferación de la bacterias *Streptococcus mutans*, fue marcadamente diferente entre la zona de inhibición tratado con yogur 1 en relación al tratamiento con yogur 2 a las 24 horas, lo que demuestra que el mejor comportamiento en el tratamiento se da con yogur 1, todos estos presentan asociación debido a que los resultados de la prueba de Tukey resultó significativa (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41351), en tal sentido existe relación entre las variables (yogur 1 en relación al yogur 2 en 24 horas del halo de inhibición de *Streptococcus mutans*), siendo la relación al azar.

GRAFICO N° 3



Contraste de Tukey ($gl=18$, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 1 y yogur 2 a las 24 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*.

TABLA N° 4

COMPARACION DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL *Streptococcus mutans* a las 48 HORAS.

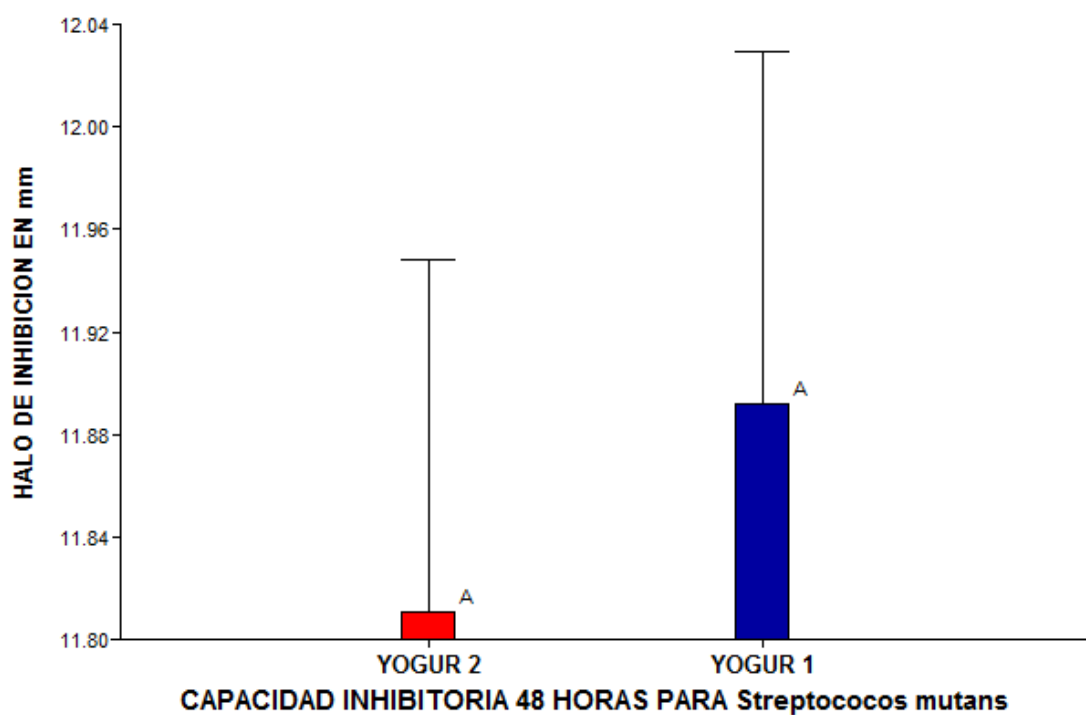
TRATAMIENTO EN LA PROLIFERACION DE LA BACTERIA <i>Streptococcus mutans</i> EN LAS PLACAS PETRY	COMPARACION INHIBITORIA DE YOGUR 1 CON EL YOGUR 2 CON CEPAS PROBIOTICAS ANTE LA PROLIFERACION DEL <i>Streptococcus mutans</i> A LAS 48 HORAS	
	PROMEDIO YOGUR 1	PROMEDIO YOGUR 2
PROMEDIO	11.89	11.81

Fuente de la Tabla N° 9 Elaboración propia de los Autores

Interpretación: En la tabla 4, Utilizando el método de Kirby Bauer para determinar el halo de inhibición, se puede observar que la relación entre el efecto inhibidor producido por yogur 1 y yogur 2 a las 48 horas frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*, en la observación in vitro, los resultados del promedio del halo de inhibición en el yogur 1 es de 11.89 mm, el promedio del halo de inhibición del yogur 2 es de 11.81 mm, existiendo una mínima diferencia en el halo de inhibición en favor al yogur 1 en 0.08 mm. Por lo que no existe diferencia marcada entre el yogur 1 y el yogur 2 a las 48 horas.

Interpretación estadística: En el análisis Estadístico observado entre la zona de inhibición de yogur 1 con el yogur 2 a las 48 horas en la proliferación de la bacterias *Streptococcus mutans*, son iguales y no son diferentes entre la zona de inhibición tratado con yogur 1 en relación al tratamiento con yogur 2 a las 48 horas, lo que demuestra que a las 48 horas el comportamiento de ambos tratamientos son iguales, todos estos presentan asociación debido a que los resultados de la prueba de Tukey resultó no significativa (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41351), en tal sentido existe relación entre las variables (yogur 1 en relación al yogur 2 a las 48 horas del halo de inhibición de *Streptococcus mutans*), siendo la relación al azar.

GRAFICO N° 4



Contraste de Tukey ($gl=18$, $\alpha = 0,05$), para encontrar diferencias entre la zona de inhibición con yogur 1 y yogur 2 a las 48 horas, frente a la proliferación de la bacteria *Streptococcus mutans*.

4.2. DISCUSIÓN

Luego de la ejecución del estudio experimental donde nuestro principal objetivo fue estudiar el efecto inhibitorio de dos yogures con cepas probióticas sobre la proliferación del *Streptococcus mutans* bucal in vitro; como resultado de ello obtuvimos que si existe la inhibición del desarrollo proliferativo de las colonias del *Streptococcus mutans* demostrándose por los halos de inhibición en la pruebas repetitivas que se realizaron, como también determinadas por las pruebas de *tukey* que arrojó un resultado significativo (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41874) para el yogur N° 1 y (Tukey Alfa = 0,05 DMS = 0,41103) para el yogur N° 2. De tal modo que el consumo del yogur con cepas probióticas podría ser una alternativa de prevención y tratamiento para contrarrestar el sobrecrecimiento y proliferación del *Streptococcus mutans* principal agente cariogénicos.

Contrastando con el trabajo realizado por Rebolledo et al. (2013) (Concepción, Chile) cuyo objetivo fue medir el efecto de las cepas probióticas *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* (LCR32) y *Lactobacillus johnsonii* (LA1) sobre el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. Trabajo que concluye aduciendo que las cepas probióticas *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus* (LCR35) y *Lactobacillus Johnsonii* (LA1) disminuyen la colonización de las principales bacterias productoras de caries dental.⁵ resultados y conclusiones que se muestran de manera semejante a los resultados que alcanzamos con nuestro estudio.

En el trabajo de investigación realizado por Valdéz J. (2016) (Quito, Ecuador) con el propósito de determinar si el *Lactobacillus casei* (variedad *rhamnosus*) del yogurt Toni LGG y de las cápsulas de Bacilor son efectivos para inhibir el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. Lo cual guarda semejanza con nuestro objetivo. Estudio que concluye resaltando lo siguiente: Las Cepas Probióticas *Lactobacillus casei* (variedad *rhamnosus*) del yogurt Toni LGG y de las cápsulas de Bacilor poseen un efecto inhibitor sobre el crecimiento in vitro del *Streptococcus mutans*, principal microorganismo causante de caries dental. El Probiótico *Lactobacillus casei* (variedad *rhamnosus*) del yogurt Toni LGG posee mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro del *Streptococcus mutans*.¹ resultados que concuerdan con los resultados que alcanzamos con nuestro estudio experimental.

Cabe resaltar nuestros resultados donde señalamos que el efecto inhibitorio de las cepas probióticas contenidas en yogur sobre el crecimiento proliferativo del *Streptococcus mutans* bucal se muestra de manera significativa, y en comparación con el trabajo de investigación realizado Hasslöf et al. (2010) (Umeå, Suecia) determina de manera semejante en sus conclusiones, estudio que tuvo por objeto investigar la capacidad de una selección de cepas de lactobacilos, usadas en productos probióticos comercialmente disponibles, para inhibir el crecimiento de los estreptococos mutans orales y *C. albicans* in vitro. Concluyendo que a concentraciones que oscilaban entre 10⁹ y 10⁵ UFC / ml, todas las cepas de lactobacilos inhibían completamente el crecimiento de los estreptococos de mutans con la excepción de *L. acidophilus* La5 que ejecutaban sólo una ligera inhibición de algunas cepas a concentraciones correspondientes a 10⁷ y 10⁵ UFC / ml. Las cepas probióticas seleccionadas mostraron una capacidad significativa pero algo variable para inhibir el crecimiento de los *Streptococcus mutans* orales y *Candida albicans* in vitro.⁶

Shakir et al. (2013) (El Cairo, Egipto) realizaron un trabajo de investigación similar al nuestro con propósito de evaluar el posible efecto inhibitorio de determinadas cepas bacterianas probióticas frente a *Streptococcus mutans* (SM) e identificar el producto lácteo más adecuado en el que la más potente cepa probiótica Exhibirá actividad inhibidora contra SM. Donde concluye de manera muy similar con nuestros resultados resaltando que: Todos los probióticos en el grupo 1-6 reducen significativamente el porcentaje de supervivencia de SM en todos los subgrupos de relación, es decir, A - C (relación de 3: 1, 1: 1 y 1: 3 SM: cepas probióticas, respectivamente), con excepción del grupo 6 en la relación subgrupo A. Con Excepción de los grupos 4 y 5 en la proporción subgrupo A, diferencia estadísticamente significativa entre todos los probióticos en la Actividad inhibidora frente al *Streptococcus mutans* oral, Diferentes probióticos en estudio reducir el transporte oral de SM con grados variables. Movido La leche fermentada que contiene *Lb reuteri* ATCC 23272 se considera el mejor vehículo de entrega de probióticos para la prevención de caries dental.⁷

En nuestro país Ríos et al. (2013) (Lima, Perú) efectuaron un estudio experimental con el objetivo de determinar el efecto inhibitorio in vitro, de un bioyogurt con cepas probióticas sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, donde se menciona en los resultados de manera muy similar resaltando que el bioyogurt comercial con cepas

probióticas, produjo una inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* de $1,4 \times 10^9$ UFC/ml a $0,083 \times 10^9$ UFC/ml ($p < 0,001$), mientras el yogurt comercial sin cepas probióticas, de 14×10^8 UFC/ml a $11,97 \times 10^8$ UFC/ml. Concluyendo que el bioyogur LAIVE que contiene las cepas *Lactobacillus paracasei subsp. Casei*, *Lactobacillus acidophilus*, y *Bifidobacterium* tiene acción efecto inhibitorio “in vitro” sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mostrando una alta significancia $p < 0,001$, por lo que puede ser beneficioso en la prevención de la caries.⁸

CONCLUSIONES

1. Los dos yogures enriquecidas con cepas probióticas si poseen efecto inhibitorio de carácter significativo ante la proliferación del *Streptococcus mutans* bucal in vitro.
2. El yogur N° 1 enriquecida con cepas probióticas si posee efecto inhibitorio significativo Ante La Proliferación Del *Streptococcus mutans* Bucal in vitro, con un mayor efecto inhibitorio a las 24 horas, capacidad del efecto inhibitorio que se reduce relativamente a las 48 horas.
3. El yogur N° 2 enriquecida con cepas probióticas si posee efecto inhibitorio significativo Ante La Proliferación Del *Streptococcus mutans* Bucal in vitro, con un mayor efecto inhibitorio a las 24 horas, poder de efecto inhibitorio que se reduce relativamente a las 48 horas.
4. Al comparar las capacidades inhibitorias se demuestra que el Yogur N° 1 posee mayor capacidad de efecto inhibitorio que el Yogur N° 2 ante Proliferación Del *Streptococcus mutans* Bucal A Las 24 Horas, mostrando una diferencia de manera significativa a favor del Yogur N° 1.
5. Al comparar las capacidades inhibitorias se demuestra que el Yogur N° 1 posee una relativa mayor capacidad de efecto inhibitorio que el Yogur N° 2 ante Proliferación Del *Streptococcus mutans* Bucal a las 48 Horas, mostrando una diferencia de manera no significativa a favor del Yogur N° 1.

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de investigación donde se evalúe la capacidad de inhibición de los probióticos ante la proliferación de microorganismos cariogénicos luego de la ingesta inmediata y diaria del yogur enriquecido con cepas probióticas.
2. Ejecutar estudios de investigación asociado a alimentos enriquecidos con cepas probióticas de modo incentiven a generar mayores inquietudes y llegar a conocimientos que aporten de manera sustancial a la ciencia que sigue esta línea de investigación.
3. Realizar estudios experimentales con el propósito de determinar mecanismos específicos de acción y concentraciones adecuadas donde las cepas probióticas alcancen un máximo potencial del efecto inhibitorio frente a la proliferación de bacterias responsables de la caries dental.
4. Bajo las premisas de los resultados obtenidos por investigaciones que anteceden a nuestro estudio y resultados obtenidos en el presente estudio recomendar a las autoridades del estado a incluir en la dieta de alimentación saludable que se provee en las instituciones de educación primarias ya que son un grupo vulnerable, la misma donde se muestran altos índices de prevalencia de caries dental.
5. Alimentos enriquecido con cepas probióticas podrían ser utilizados como apoyo en la prevención y profilaxis de las enfermedades a nivel bucal y como para la salud en general, por lo que se recomienda a los producción y el consumo de alimentos con agregados probióticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Valdez J. Acción probiótica del *Lactobacillus casei* sobre el *Streptococcus mutans*. Estudio comparativo in vitro”. [Tesis para optar título]. Quito: Universidad Central Del Ecuador; 2016.
2. Organización mundial de la salud – OMSCP. Nota informativa N° 318. SALUD BUCODENTAL [Internet]. 2017 [citado 14 marzo 2017]; 318(1):1-2. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>.
3. Ministerio De Salud Del Perú – MINSA. Estrategias de abordaje preventivo nacional. SALUD BUCAL [Internet]. 2017 [citado 14 marzo 2017]; 1(13):1. Disponible en: https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13.
4. Muñoz K, Alarcón M. Efecto de los Probióticos en las Condiciones Periodontales Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 2010 noviembre 3(3); 136-139.
5. Rebolledo, m., rojas, e., & salgado, f. Efecto de dos probióticos que contienen cepas de *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus y *Lactobacillus johnsonii* sobre el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. Int. J. Odontostomat. 2013 Octubre 7(3):415-419.
6. Hasslöf et al., Growthinhibition of oral mutans streptococci and candidabycommercialprobioticlactobacilli - an in vitro study BMC Oral Health 2010, 10:18.
7. ShakirAbdalazizAbdallahOsman, AliAliMortada, Randa youssef& Osama Ibrahim A. El-Batawy. InhibitoryEffect of DifferentProbioticBacterialStrainsonSalivary Streptococcus mutans and Identification of themostSuitableDairyProductforDelivery of themostPotentOne: An In-vitro Study. NatSci 2013;11(12):188-195]. (ISSN: 1545-0740). Disponible en: <http://www.sciencepub.net/nature>.
8. Rios T, Quispe G. Efecto Inhibitorio In Vitro De Un Bioyogurt Con Cepas Probioticas Sobre El Crecimiento De Streptococcus Mutans ATCC 25175 Vis.dent.(Lim.) 2013, mayo 16 (2) 129-140.
9. Huamani D. Estudio in vitro del efecto inhibitorio de un bioyogurt con cepas probióticas: 1. Reuteri, 1. Rhamnosus, 1. Johnsonii, sobre el crecimiento del *Porphyromonagingivalis*, en los laboratorios de la Ucsm, arequipa 2016 [tesis]. Arequipa - Peru: Universidad Catolica Santa Maria Arequipa. 2016
10. Organización Mundial de Gastroenterología – OMGE© WorldGastroenterologyOrganisation. Guías prácticas de la OMGE Probióticos y prebióticos [Internet]. Octubre del 2011 [citado 16 mayo 2017] disponible en: <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-spanish-2011.pdf>
11. Ortega Anta, R., Marcos Sánchez, A., ArancetaBartrina, J., Mateos Guardia, J. A.,

- Requejo Marcos, A. M., & Serra Majem, L. Alimentos Funcionales. Probióticos. (2002). Madrid, España: Médica Panamericana.
12. Santana, E. Vademecum Nutricional: Alimentos Funcionales. Buenos Aires, Argentina: (2009). Librería Akadia.
 13. Zalba JI, Fernández AJ. Empleo de probióticos en odontología; NutrHosp. 2013; 28(1) 49-50
 14. Meurman JH, Stamatova I. Probiotics contributions to oral health. Oral Diseases. [Internet] 2007; [citado 18 octubre 2017]; 13: 443-51. Disponible en: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-0825.2007.01386.x/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=www.ncbi.nlm.nih.gov&purchase_site_license=LICENSE_D ENIED.
 15. Rodríguez O., Holguín MP., Guzmán AI. Utilización de probióticos en Odontología Preventiva; Rev. Acad. Mex. Odon. Ped. 2012; 24(2): 85-89
 16. Pérez-Luyo A. Probióticos: Una nueva alternativa en la prevención de la caries dental?; Rev Estomatol Herediana. 2008; 18(1):65-68.
 17. Tormo R. Probióticos. Concepto y mecanismos de acción, Anales de pediatría, AnPediatr (Barc); [Internet] 2006; [citado 18 octubre 2017]; 04 Supl 1:30-41. Disponible en: <http://www.analesdepediatría.org/es/probioticos-concepto-mecanismos-accion/articulo/13092364/>
 18. Ortiz e, guinot f, mayné r, Belletlj. Probióticos: efecto preventivo sobre la caries dental. Odontologia Pediátrica Madrid arán ediciones, s. L. 2009; 17(3) 169-185.
 19. Borrell C. Estudio experimental del uso de Lactobacillusreuteri DSM 17938 y ATCC PTA 5289 sobre índices de salud bucodental en una población escolar [Tesis Doctoral] Valencia: Universidad Cardenal Herrera-CEU; 2015.
 20. Vistoso A. Efecto del consumo de leche enriquecida con probióticos lactobacilos, en la incidencia de lesiones de caries en niños preescolares [Tesis para optar título] Universidad De Chile Facultad De Odontología; Santiago – Chile: 2013.
 21. Salud Ok; Propiedades de los alimentos, Yogurt Probiótico: [Internet] 2017; [citado 18 octubre 2017] disponible en: <http://saludok.com/yogurt-probiotico.html>
 22. Salud y medicina; Probióticos; Beneficios Para La Salud Tipos, Bacterias, Dosis; [internet] 2009 [citado 20 octubre 2017] disponible en: <https://historiaybiografias.com/probioticos/>
 23. Russo J. Los efectos secundarios de los probióticos; muy fitnes: [internet] 2017 [citado 20 octubre 2017] disponible en: https://muyfitness.com/los-efectos-secundarios-de-los-probioticos_13108922/
 24. Plazas LA. Recuento E Identificación De Streptococcus Mutans De Saliva En Niños

- Con Caries Dental: Seguimiento A 3 Y 6 Meses Después De Un Proceso Educativo [Tesis para optar título] Pontificia Universidad Javeriana Facultad De Ciencias Básicas; Bogota – Colombia; 2015.
25. Liébana J. Microbiología Oral. 2a ed. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana; 2002.
 26. Koneman EW, Allen S. Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas. : Ed. Médica Panamericana; 2008.
 27. Ojeda JC, Oviedo E, Salas LA. Streptococcus mutans and dental caries; Revista CES Odontología ISSN 0120-971X: junio de 2013; 26(1) 44-56.
 28. 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; JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 2004; 42(1) 198–202.
 29. Negroni, M. Microbiología Estomatológica. 2da ed. Buenos Aires: Ed. Medica Panamericana; 2009.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Universidad Nacional del Altiplano Puno

VRI
Vicerrectorado de Investigación

PILAR
Plataforma de Investigación
Universitaria Integrada a la Labor Académica con Responsabilidad

2017-034

2017-034

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO DE TESIS

En la Ciudad Universitaria, a los 25 días del mes MAYO del 2017 siendo horas 09:49:07. Los miembros del Jurado, declaran APROBADO POR UNANIMIDAD el PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE TESIS titulado:

ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO INHIBITORIO DE DOS YOGURES CON CEPAS PROBIÓTICAS ANTE LA PROLIFERACIÓN DEL STREPTOCOCCUS MUTANS BUCAL - PUNO 2017.

Presentado por los Bachilleres:

**EDWIN RENE QUISPE RONCALLA
CLAUDIA LIGUE CATI**

De la Escuela Profesional de:

ODONTOLOGÍA

Siendo el Jurado Dictaminador, conformado por:

Presidente	: Dr. JORGE LUIS MERCADO PORTAL
Primer Miembro	: BETSY QUISPE QUISPE
Segundo Miembro	: NELLY BEATRIZ QUISPE MAQUERA
Director/Asesor	: CD. CESAR AUGUSTO MOLINA DELGADO

Para dar fe de este proceso electrónico, el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional del Altiplano - Puno, mediante la Plataforma de Investigación se le asigna la presente constancia y a partir de la presente fecha queda expedito para la ejecución de su PROYECTO DE INVESTIGACIÓN DE TESIS.

Puno, MAYO de 2017

VRI UNA Puno - 2017

Código: 2017-034

Vicerrectorado de Investigación
Teléfono 951-365054
e-mail: vriunap@gmail.com
web: http://vriunap.pe

DR. WENCESLAO MEDINA ESPINOZA
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN

ANEXO N°2

**SOLICITO: SOLICITO AUTORIZACION PARA LA
RECOLECCION DE MUESTRAS EN LA
CLINICA ODONTOLOGICA.**

**SEÑOR DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA DE
LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO.**



Nosotros: EDWIN RENE QUISPE RONCALLA Y CLAUDIA LIGUE CATI. estudiantes tesis de la escuela profesional de odontología de nuestra Universidad Nacional Del Altiplano Puno; con domicilio legal en la av. Floral No. 657, de esta ciudad de Puno con Telefono No. 951133320, e-mail: windenerdent@gmail.com, ante usted nos presentamos con el debido respeto para expresarle lo siguiente:

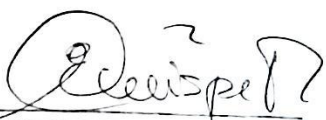
Que ya contando con el acta de probación de nuestro proyecto de investigación que trata de sobre el **ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO INHIBITORIO DE DOS YOGURES ANTE LA PROLIFERACIÓN DEL ESTREPTOCOCCUS MUTANS PUNO 2017**; y en aras de proseguir con uno de los pasos de nuestra metodología de investigación hacemos la documentación correspondiente, solicitando a su despacho la autorización para la recolección de muestras que consta de caries activa de los pacientes en nuestra clínica odontológica.

- Adjunto "Acta de aprobación del proyecto de investigación."

POR LO EXPUESTO:

Solicitamos a usted, señor Director acceder a nuestra petición por ser justa y legal.

Puno, 15 de Junio del 2017


 QUISPE RONCALLA EDWIN RENE
 DNI N° 44478541


 LIGUE CATI CLAUDIA
 DNI N° 44478541

ANEXO N° 3

**SOLICITO: SOLICITO AUTORIZACION EL USO DE
LABORATORIOS DE MICROBIOLOGIA
PARA LA EJECUCION DEL PROYECTO
DE INVESTIGACION.**

**Sr. DR. SABINO ATENCIO LIMACHI.
DECANO DE LA FACULTAD CIENCIAS BILOGICAS DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO.**



Nosotros estudiantes tesistas de la escuela profesional de odontología de nuestra Universidad Nacional Del Altiplano Puno; con domicilio legal en la av. Floral No. 657, de esta ciudad de Puno con Teléfono No. 951133320, e-mail: windenerdent@gmail.com, ante usted nos presentamos con el debido respeto para expresarle lo siguiente:

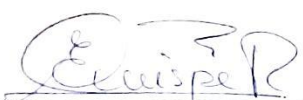
Que ya contando con el acta de probación de nuestro proyecto de investigación que trata de sobre el **ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO INHIBITORIO DE DOS YOGURES ANTE LA PROLIFERACIÓN DEL *Streptococcus Mutans* PUNO 2017**; en aras de proseguir con la ejecución de nuestro proyecto de investigación hacemos la documentación correspondiente, solicitando a su despacho conceda la autorización para el uso de los laboratorios de microbiología.


- Adjunto "Acta de aprobación del proyecto de investigación."

POR LO EXPUESTO:

Solicitamos a usted, señor Decano acceder a nuestra petición por ser justa y legal.

Puno. 15 de Junio del 2017


 QUISPE RONCALLA EDWIN RENE
 DNI N° 44478541


 LIGÜE CATI CLAUDIA
 DNI N° 44478541

ANEXO N° 4

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA
LABORATORIOS

CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE JEFE DEL LABORATORIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA - PUNO.

HACE CONSTAR:

Que los bachilleres: CLAUDIA LIGUE CATI y EDWIN RENE QUISPE RONCALLA, egresados de la Escuela Profesional De Odontología de la Universidad Nacional de Altiplano Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado “ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO INHIBITORIO DE DOS YOGURES CON CEPAS PROBIÓTICAS ANTE LA PROLIFERACIÓN DEL *Streptococcus mutans* BUCAL - PUNO 2017” en los laboratorios de zoología y microbiología de la escuela profesional de biología, entre los meses de **julio a octubre del 2017**.

Se emite la presente constancia a la solicitud de los interesados para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 16 de octubre del 2017.


 Edilberto Longo Palacios Frisancho
 D. N.º 2125


 Buenaventura O. Carpio Vásquez
 CEP N° 1068

ANEZO N° 5

MATRIZ DE DATOS N° 1

YOGURT PROBIOTICO 1									
P1		P2		P3		P4		P5	
24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H
16.2	12.6	15.5	12.1	16	12.5	15.1	11.7	15.4	12
16	12.4	16	12.6	16	12.6	14.9	11.5	15	11.4
15.8	12.5	15.8	12.4	15.5	12.1	15	11.6	15.5	12.1
15.6	12	16	12.5	16	12.8	14.9	11.3	14.8	11
15.5	12.1	15.5	12	16.3	12.9	15.1	11.5	14.9	11.5
16	12.4	15.8	12.3	15.5	12	15.5	12	14.5	11.1
15.85	12.33	15.77	12.32	15.88	12.48	15.08	11.60	15.02	11.52
P6		P7		P8		P9		P10	
24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H
14.8	11.2	15	11.6	16.2	12.5	14.8	11.4	15.2	11.6
15	11.5	14.8	11.4	16	12.4	15.2	11.5	15	11.4
15.5	12.1	15.3	11.5	16.1	12.7	14.5	11	15.4	12
15	11.6	14.5	11.1	15.9	12.5	14.8	11.4	15.6	12
14.6	11.2	15	11.5	15.8	12	14.9	11.5	15.8	12.2
15	11.7	15.5	11.6	15.9	12.5	15	11.4	15.7	12
14.98	11.55	15.02	11.45	15.98	12.43	14.87	11.37	15.45	11.87

P : Placa petri
mm : milímetros
H : Horas

MATRIZ DE DATOS N° 2

YOGURT PROBIOTICO 2									
P1		P2		P3		P4		P5	
24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H
11.8	11	12	11	13	12	13	12	13	12.2
12.5	11.5	11.5	10.8	13.1	12.3	13.5	12.5	12.5	11.5
12	11.2	13	12.2	13.5	12.7	13	12.5	13	12
12.5	11.6	13.5	12.7	13	12.2	13.5	12.7	13	12.2
12.7	11.6	12.8	12.2	13.5	12.5	13.2	12.4	12.5	11.5
11.8	11.3	13.2	12.4	13	12.4	13.3	12.5	12.5	11.7
P6		P7		P8		P9		P10	
24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H	24 H	48 H
12.8	12	12.5	11.7	13	12.2	12	11.2	13	12.2
13	12.2	12.5	11.5	13.5	12.5	11.9	11.1	12.5	11.7
12.5	11.5	11.8	11	13	12.2	11.8	11	12	11
13	12.5	11.9	11	12.9	12	12	11.2	12.5	11.5
12.8	12	12	11.2	12.8	12	12.5	11.7	12	11.2
12.5	11.7	12.2	11.5	13	12.2	12	11.2	12	11.4

P : Placa petri.
H : Horas.
mm : Datos interpretados en milímetros.

ANEXO N° 6



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



CERTIFICACION DE LA CEPA BACTERIANA

EL QUE SUSCRIBE:

Certifica que la pureza del *Streptococcus mutans*, se ha obtenido tomando en cuenta el siguiente procedimiento:

1. El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento es TRIPTICASA DE SOYA, para ver su actividad hemolítica se realiza la réplica en agar sangre.
2. Para la identificación del *Streptococcus mutans* se tomó en cuenta los criterios fenotípicos:
 - a) Morfología macroscópica (colonias): opacas, convexas e irregulares en su forma y superficie granular.
 - b) Morfología microscópica y características tintoriales: Cocos Gram positivos, se asocian en parejas y cadenas cortas o largas.
 - c) Requerimientos ambientales para el crecimiento: Anaerobios facultativos, aumenta su crecimiento en presencia de CO₂ al 5% y a 37°C.
 - d) Resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos: sensibles a penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, aminoglucosidos, vancomicina, rifampina, clotrimoxazol, lincosamidas y cloranfenicol.
 - e) Propiedades bioquímicas: Esculina, inulina, manitol, rafinosa y rosbitol positivos. No producen catalasa y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico.
3. Para realizar la identificación del *Streptococcus mutans* se toma en cuenta en criterio genotípico según la prueba de PCR. Serotipos: c, e y f.

NOTA: Para la obtención de esta cepa pura se siguió los métodos estándares propuesto por el Instituto Nacional de Salud.



Salvo Lergio Palacios Friancho
BIÓLOGO
C.B.P. N° 2125

ANEXO N° 7



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



CERTIFICACIÓN DEL ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

DE (YOGUR N° 1) - (YOGUR N° 2)

EL QUE SUSCRIBE:

Certifica que el contenido de la presencia de cepas probióticas principalmente de las bacterias del grupo de *lactobacillus spp.* Cuenta con el siguiente procedimiento:

1. El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento es AGAR – COLUMBIA con COLESTINA y ácido NALIDIXICO (CNA).
2. Para la identificación de las cepas de *lactobacillus spp.* se tomó en cuenta los criterios fenotípicos:
 - a. Morfología macroscópica (colonias): opaca, contorno redondo y ligeramente liso con superficie aplanada, translúcida e irregular, frecuentemente con aspecto de cristal.
 - b. Morfología microscópica y características tintoriales: *bacillus* Gram positivos, asociadas en colonias de cadenas largas y filamentosas y las formas en maza no son raras.
 - c. Requerimientos ambientales para el crecimiento: requiere incubación a 35 °C en dióxido de carbono CO₂ con una concentración al 10% evaluación a las 48h.
 - d. Resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos: sensible a penicilina G, ampicilina, cefalosporinas y clindamicina. Resistentes a la bancomicina y son alfa α hemolíticos.
 - e. Propiedades bioquímicas: catalasa negativos (-), glucosa positivos (+), manitol (+) CAMP^c (+)
3. Para determinar la carga bacteriana de cepas probióticas se tomó muestras representativas de ambos yogures para conocer el número de bacterias por unidad de volumen, recuento realizado por medios físicos independientemente a que si estén muertos o no. Determinándose que el Yogur N°1 contiene mayor carga bacteriana que el Yogur N° 2.

NOTA: Para el análisis bacteriológico se siguió los métodos estándares propuestos por el Instituto Nacional De Salud Del Perú. Además de que no se indica el nombre y la marca de los productos en mención por motivos de no transgredir ni infringir con los Código de Ética y Conducta Comercial que son directrices de Gobierno Mercantil.


 Walter Leyva Palacios Frisancho
 BIÓLOGO
 D.B.P. N° 2125

ANEXO N° 8

ANALISIS ESTADISTICO

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HALO DE INHIBICION mm	20	0.94	0.94	3.27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	61.18	1	61.18	308.01	<0.0001
CAPACIDAD INHIBITORIA	61.18	1	61.18	308.01	<0.0001
Error	3.58	18	0.20		
Total	64.76	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.41874

Error: 0.1986 gl: 18

CAPACIDAD INHIBITORIA Medias n E.E.

yogur 1 48horas	11.89	10	0.14	A
yogur 1 24horas	15.39	10	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
Halo de Inhibicion 24 hora..	10	15.39	0.44	15.07	15.71	110.17	<0.0001
Halo de Inhibicion 48 hora..	10	11.89	0.45	11.57	12.21	83.65	<0.0001

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HALO DE INHIBICION EN mm	20	0.92	0.91	3.14

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	37.87	1	37.87	195.50	<0.0001
CAPACIDAD INHIBITORIA 24 H..	37.87	1	37.87	195.50	<0.0001
Error	3.49	18	0.19		
Total	41.35	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.41351

Error: 0.1937 gl: 18

CAPACIDAD INHIBITORIA 24 H.. Medias n E.E.

yogur 2	12.64	10	0.14	A
yogur 1	15.39	10	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HALO DE INHIBICION mm	20	0.50	0.47	3.58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.44	1	3.44	17.95	0.0005
CAPACIDAD INHIBITORIA	3.44	1	3.44	17.95	0.0005
Error	3.44	18	0.19		
Total	6.88	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.41103

Error: 0.1914 gl: 18

CAPACIDAD INHIBITORIA Medias n E.E.

yogur 2 48horas 11.81 10 0.14 A

yogur 2 24horas 12.64 10 0.14 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Prueba t para una media

Valor de la media bajo la hipótesis nula: 0

Variable	n	Media	DE	LI(95)	LS(95)	T	p(Bilateral)
Halo de inhibicion 24horas..	10	12.64	0.44	12.32	12.95	91.14	<0.0001
Halo de inhibicion 48horas..	10	11.81	0.44	11.50	12.12	85.56	<0.0001

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HALO DE INHIBICION EN mm	20	0.01	0.00	3.74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.03	1	0.03	0.18	0.6803
CAPACIDAD INHIBITORIA 48 H..	0.03	1	0.03	0.18	0.6803
Error	3.53	18	0.20		
Total	3.57	19			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.41629

Error: 0.1963 gl: 18

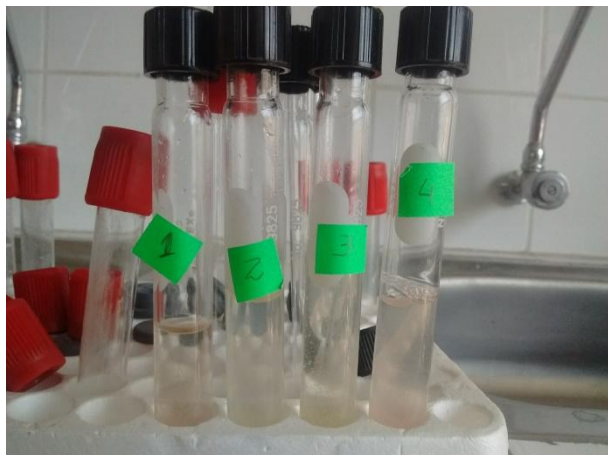
CAPACIDAD INHIBITORIA 48 H.. Medias n E.E.

YOGUR 2 11.81 10 0.14 A

YOGUR 1 11.89 10 0.14 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

ANEXO N° 6 GALERIA DE FOTOGRAFIAS.



Toma de muestra de tejido dental cariado.



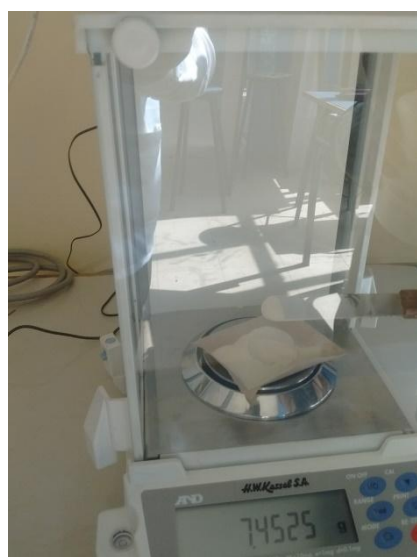
Siembra y aislado de la bacteria
Streptococcus mutans



Unidad formadora de colonia SM



Dilución - método Kirby Bauer



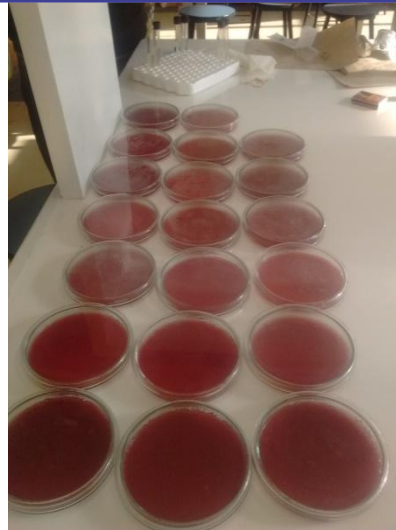
Preparado de medio de cultivo.



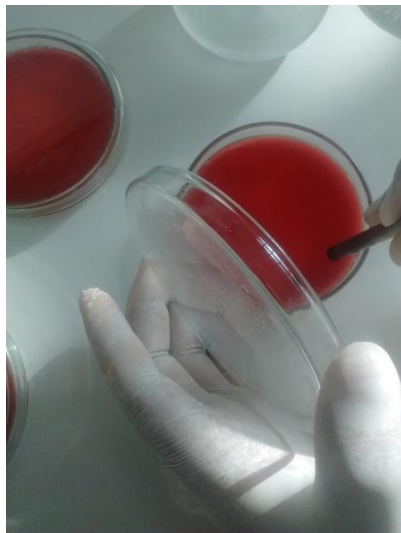
Preparado de medio de cultivo.



**Preparado de medio de cultivo.
Agar - sangre**



**Preparado de medio de cultivo.
Agar - sangre**



Preparado de posillos de tratamientos



Colocado de discos de antibiograma



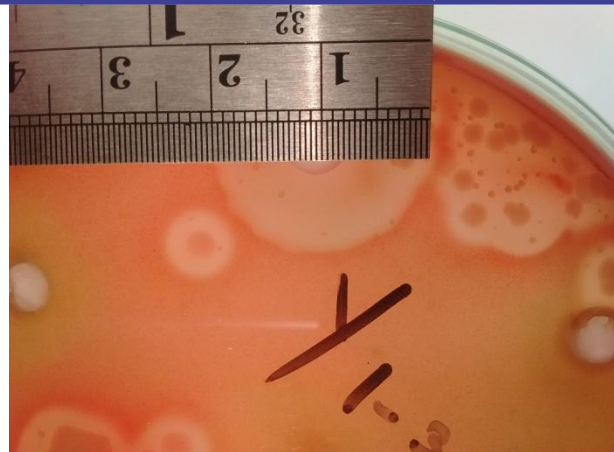
Inoculación del yogur con cepas probióticas



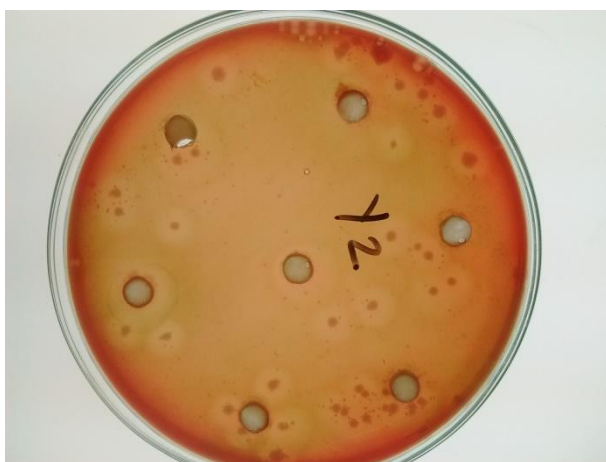
Incubación a 37 °C



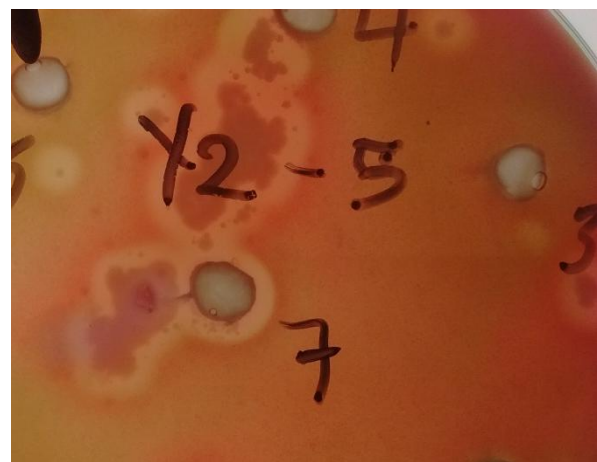
Resultados: del yogur N° 1



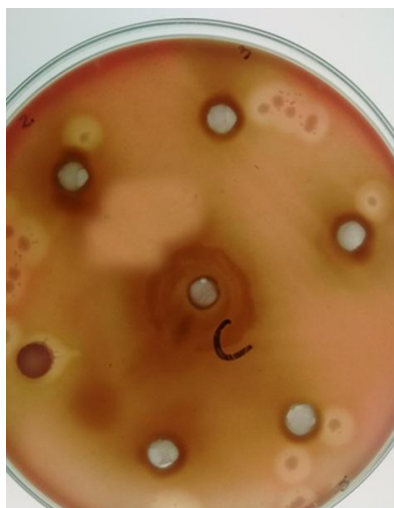
Resultados: del yogur N° 1



Resultados: del yogur N° 2



Resultados: del yogur N° 2



Resultados: del grupo control



Resultados: del grupo control