



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO
ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS
METANÓLICOS DE LAS ALGAS MARINAS
SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans*
(ATCC®35668™)**

TESIS

Para optar el título profesional de:
CIRUJANO DENTISTA

AUTOR

Cavero Tasayco, Maryori Alexandra
[\(0000-0002-8318-4188\)](tel:0000-0002-8318-4188)

Angeles Bonelli, Gianella Solange
[\(0000-0001-5897-5407\)](tel:0000-0001-5897-5407)

ASESOR DE TESIS:

Dra. del Valle Mendoza, Juana
[\(0000-0002-6011-5040\)](tel:0000-0002-6011-5040)

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

*A nuestros padres, quienes fueron de apoyo incondicional durante este
proceso.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida.

A nuestras asesoras Juana del Valle y Stefany Caballero por su apoyo y exigencia.

A mis profesores de quienes he recibido la mejor formación sobre esta carrera.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de cuatro extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™).

Metodología: El presente estudio fue de tipo experimental *in vitro*, en el cual se prepararon cuatro extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*. Para cada extracto se realizaron 6 pruebas independientes y como control positivo se utilizó la solución de Clorhexidina al 0.12%. Para evaluar el efecto antibacteriano de los extractos se utilizó el método de difusión en pozo de Kirby-Bauer. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) fueron evaluadas mediante el método de microdilución y el efecto citotóxico fue determinado por el método de MTT.

Resultados: Se observó mayor efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de *Lessonia trabeculata* y *Macrocystis pyrifera* sobre cepas de *Streptococcus mutans*, mostrando halos de inhibición de 18.1 mm + 0.75 mm y 12.25 mm + 0.69 mm respectivamente. Mientras que los extractos metanólicos de *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* mostraron menor efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans*, observándose halos de 10.08 mm + 0.46 mm y 9.32 mm + 0.49 mm respectivamente.

En todos los casos, los extractos metanólicos muestran una baja citotoxicidad sobre células MDCK, observando una viabilidad celular de 66% para el caso de *Lessonia trabeculata*, 85% para el caso de *Chondracanthus chamissoi*, 65% para el caso de *Lessonia nigrescens* y 79% para el caso de *Macrocystis pyrifera*.

Conclusiones: Se determinó que los cuatro extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* presentan efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans*, mostrando diferencias significativas entre ellos. Además, los cuatro extractos metanólicos presentan bajo efecto citotóxico sobre MDCK a altas concentraciones.

Palabras clave: *Streptococcus mutans*, efecto antibacteriano, algas marinas,
Macrocystis pyrifera, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens*, *Chondracantus*
chamissoi, Phaeophyta, Chlorophyta

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the antibacterial of the methanolic extracts of *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* and *Chondracanthus chamissoi* against *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™).

Material and methods: The present study was of experimental type *in vitro*, in which four methanolic extracts of *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* and *Chondracanthus chamissoi* were prepared. For each extract 6 independent tests were performed and as a positive control, the 0.12% Chlorhexidine solution was used. He went with the method of diffusion in the well of Kirby-Bauer, then proceeded to the reading of the halos with an external cover Vernier. Likewise, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (CMB) of the extracts were found and the cytotoxic effect of each methanolic extract was determined with the MTT method.

Results: A higher antibacterial effect was found in the methanolic extracts of *Lessonia trabeculata* and *Macrocystis pyrifera* with halos of 18.1 mm + 0.75 mm and 12.25 mm + 0.69 mm respectively on *Streptococcus mutans* respectively; however, it has the minor antibacterial effect of the methanolic extracts of *Lessonia nigrescens* and *Chondracanthus chamissoi* with halos of 10.08 mm + 0.46 mm and 9.32 mm + 0.49 mm. In cell viability, *Lessonia trabeculata* showed an effect at 66% of concentration similar to or less than 10000 mg / ml of the extract, while the extract of *Chondracanthus chamissoi* showed an effect superior to 84%, the extract of *Lessonia nigrescens* to 65% and the extract derived from *Macrocystis pyrifera* at 79%.

Conclusions: It was determined that the four algae have an antibacterial effect against *Streptococcus mutans*, however there is a statistically significant difference between the extracts of *Macrocystis pyrifera* and *Lessonia trabeculata* with the extracts of *Lessonia nigrescens* and *Chondracanthus chamissoi*. Likewise, the four algae have low cytotoxic effect at high concentrations.

Key words: *Streptococcus mutans*, antibacterial effect, seaweed, *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens*, *Chondracanthus chamissoi*, Phaeophyta, Chlorophyta

TABLA DE CONTENIDO

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1. Justificación	3
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS	4
CAPÍTULO 4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo General.....	5
4.2 Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS	6
5.1 Diseño del estudio	6
5.2 Grupo experimental	6
5.3 Operacionalización de Variables	8
5.4 Técnicas y procedimientos	9
5.5 Plan de análisis	13
5.6 Consideraciones éticas	13
CAPÍTULO 6. RESULTADOS.....	14
CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN	20
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Lessonia trabeculata</i> , <i>Lessonia nigrescens</i> y <i>Chondracanthus chamissoi</i> sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC®35668™).....	15
TABLA 2 Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida de los extractos metanólicos de las algas marinas sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC®35668™).....	17
TABLA 3 Evaluación de la viabilidad celular de las células MTT frente a los extractos metanólicos de las algas marinas <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Lessonia trabeculata</i> , <i>Lessonia trabeculata</i> , <i>Lessonia nigrescens</i> y <i>Chondracanthus chamissoi</i>	18

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Lessonia trabeculata</i> , <i>Lessonia nigrescens</i> y <i>Chondracanthus chamissoi</i> sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC®35668™).....	16
GRÁFICO 2 Evaluación de la viabilidad relativa de las células MTT frente a los extractos metanólicos de las algas marinas <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Lessonia trabeculata</i> , <i>Lessonia trabeculata</i> , <i>Lessonia nigrescens</i> y <i>Chondracanthus chamissoi</i>	19

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad que se produce mediante procesos dinámicos de remineralización y desmineralización de la estructura dental, el cual es causada por bacterias que producen ácidos que destruyen las estructuras dentales. ^(1,2) En la microbiota de la cavidad bucal, la mayor parte de patógenos son las bacterias gram positivas, entre la que destaca el el *Streptococcus mutans*, el cual es el principal agente etiológico responsable de la formación de la caries dental. ^(3,4) Por este motivo, se han desarrollado diversos productos, como enjuagues bucales y pastas dentales, que permitan contrarrestar la actividad antibacteriana de este patógeno.

Actualmente, han incrementado las investigaciones sobre la medicina alternativa en base a plantas naturales conocida como Fitoterapia, la cual busca desarrollar agentes antimicrobianos naturales económicos y eficaces contra patógenos de la cavidad bucal, con menos efectos adversos y de mayor disponibilidad para la población. ⁽⁵⁾ La fitoterapia es una ciencia que nos permite utilizar las plantas con fines terapéuticos, es decir obtener mayor conocimiento acerca de las variedades de especies vegetales que existen en la naturaleza y de tal forma aplicar sus propiedades en los diversos problemas de la salud. ⁽⁶⁾

Las algas marinas han demostrado tener propiedades beneficiosas para la salud humana como lo indica un estudio realizado por Frikha et al. Este estudio muestra que las algas marinas son una fuente potencial de compuestos bioactivos que generan propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antioxidantes frente a bacterias tales como *Escherichia coli* y *Staphylococcus simulans*, esta última pertenece al grupo de bacterias gram positivas como el *Streptococcus mutans*. ⁽⁷⁾

Según el Instituto del Mar del Perú, las algas marinas más abundantes en el litoral del mar peruano son *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*; las cuales son de fácil acceso para la población costera. Además, *Chondracanthus chamissoi* está incluido en la dieta alimenticia de manera regular. ⁽⁸⁾ Sin embargo, no existen estudios previos realizados sobre la actividad antimicrobiana de estas cuatro algas marinas sobre bacterias de la cavidad bucal.

El propósito de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™).

CAPÍTULO 2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Justificación

En la actualidad, la odontología se ha enfocado en desarrollar la promoción y prevención oral. Según el MINSA, en Perú el índice de caries es de 85,6% ⁽⁹⁾ y es por este motivo que se reestableció la Estrategia Sanitaria Nacional de Salud Bucal de la dirección general de salud de las personas, teniendo entre sus principales funciones la gestión de las actividades promocionales, preventivas, recuperativas y de rehabilitación en todas las etapas de vida en el marco de la atención integral de salud. ⁽¹⁰⁾

A la fecha no se han realizado estudios sobre el efecto antibacteriano de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus Chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Por este motivo, este estudio tiene importancia teórica debido a que generará nuevos conocimientos en el ámbito odontológico sobre nuevos productos naturales a base de algas que permitan el control de la actividad bacteriana en la cavidad bucal, lo cual será un nuevo aporte de información para el desarrollo de productos preventivos contra la caries dental.

Por otro lado, este estudio presenta importancia clínica debido a que los resultados que se obtendrán en el estudio *in vitro* nos permitirá proponer nuevas soluciones y brindar un aporte en el ámbito odontológico, como es el desarrollo y aplicación de enjuagues bucales y pasta dentales a base de las algas marinas estudiadas para el control de la bacteria *Streptococcus mutans* en la cavidad oral.

CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* presentan efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus mutans*.

CAPÍTULO 4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar *in vitro* el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)
2. Determinar *in vitro* el efecto bacteriostático y bactericida de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)
4. Determinar el efecto citotóxico de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre línea celular MDCK
5. Comparar el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)

CAPÍTULO 5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio

El diseño del estudio fue de tipo experimental *in vitro*.

5.2 Grupo experimental

La unidad de análisis está conformada por:

Pocillos embebidos del extracto metanólico de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* colocados en placas petri que contienen cultivos de *Streptococcus mutans*.

Líneas celulares MDCK cultivadas en placas estériles de 96 pocillos, embebidas con medio de cultivo DMEN modificado y los extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* evaluados de manera independiente.

Se formaron los siguientes grupos:

Grupo 1: Pocillos con extracto metanólico de *Macrocystis pyrifera*, sobre cultivos de *Streptococcus mutans* a 48 hrs.

Grupo 2: Pocillos con extracto metanólico de *Lessonia trabeculata*, sobre cultivos de *Streptococcus mutans* a 48 hrs.

Grupo 3: Pocillos con extracto metanólico de *Lessonia nigrescens* sobre cultivos de *Streptococcus mutans* a 48 hrs.

Grupo 4: Pocillos con extracto etanólico de *Chondracanthus chamissoi* sobre cultivos de *Streptococcus mutans* a 48 hrs.

Grupo 5: Pocillos con extracto metanólico de *Macrocystis pyrifera*, sobre cultivos de células MDCK.

Grupo 6: Pocillos con extracto metanólico de *Lessonia trabeculata*, sobre cultivos de células MDCK.

Grupo 7: Pocillos con extracto metanólico de *Lessonia nigrescens*, sobre cultivos de células MDCK.

Grupo 8: Pocillos con extracto metanólico de *Chondracanthus chamissoi*, sobre cultivos de células MDCK.

Criterios de selección:

1. Pocillos embebidos con extracto metanólico de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* a diferentes concentraciones sobre cepas de *Streptococcus mutans*.
2. Pocillos contienen células MDCK con extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* a diferentes concentraciones. Condiciones controladas de línea celular MDCK (medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, 25 µg/L de gentamicina y 200 mM L-glutamina a 37°C y 5% CO₂

5.3 Operacionalización de Variables

Variable	Definición operacional	Indicadores	Tipo	Escala de medición	Valores
Efecto antibacteriano	Capacidad de eliminar e inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano	Método de Kirby Bauer (Halos de inhibición del crecimiento bacteriano)	Cuantitativo	Razón Continua	Tamaño de halo de inhibición en mm
Efecto bacteriostático	Capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano	Método de Kirby Bauer (Halos de inhibición del crecimiento bacteriano)	Cuantitativo	Razón Continua	Tamaño de halo de inhibición en mm
Efecto bactericida	Capacidad de eliminar el crecimiento y desarrollo bacteriano	Unidad Formadora d Colonia (UFC)	Cuantitativo	Razón Discreta	Nº colonias (UFC)
Extractos metanólicos de algas marinas	Solución resultante del proceso de maceración para extraer los compuestos químicos	Concentración de las diferentes especies de algas marinas	Cualitativo	Nominal Politémica	Extractos metanólicos de las algas: <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Lessonia trabeculata</i> , <i>Lessonia nigrescens</i> y <i>Chondracanthus chamissoi</i> marinas
Concentración mínima inhibitoria (CMI)	Mínima cantidad del antimicrobiano que inhibe el crecimiento de una bacteria	Método de colonia UFC	Cuantitativo	Razón Discreta	Nº colonias (UFC)
Efecto citotóxico	Capacidad de una sustancia para medir la viabilidad celular	Células MDCK	Cuantitativo	Razón Continua	Método de Absorbancia (CC50 ug/ml)

5.4 Técnicas y procedimientos

Solicitud de permiso para el uso de laboratorios

Se solicitó permiso al responsable del laboratorio de Biología Molecular, Bioquímica y Biología Celular del Instituto de Investigación Nutricional.

Extractos metanólicos

Se solicitó al Instituto del Mar del Perú (IMARPE) las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*, las cuales fueron proporcionadas para fines de investigación.

Las algas secas fueron colocadas en frascos de vidrio estériles y posteriormente se adicionó metanol puro en la proporción 1P:1V (peso/volumen). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente, protegidas de la luz con ayuda de papel aluminio, durante 7 días. Transcurrido el tiempo, las muestras fueron filtradas con ayuda de un papel de filtro Whatman N° 4, el sobrenadante fue colectado en un tubo de 50 ml estéril y finalmente evaporadas a 55°C hasta eliminar los restos de metanol completamente. ⁽¹¹⁾

Los extractos metanólicos fueron almacenados a 4°C hasta su uso. **(Anexo 1)**

Preparación de placas de agar Trypticase Soy Agar (TSA)

Para el cultivo de *Streptococcus mutans*, se procedió a preparar placas de agar TSA. Para lo cual se pesó 10 gramos del medio de cultivo agar TSA, el cual fue vertido en una botella de vidrio estéril, luego se adicionó 250 ml de agua destilada, el contenido fue homogenizado y posteriormente autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

Transcurrido el tiempo, la muestra fueron retiradas del autoclave y vertida en placas Petri de 15 ml de diámetro, todo el procedimiento se realizó en condiciones de bioseguridad II. Las placas fueron controladas a temperatura ambiente durante 3 días y descartar de esta manera cualquier contaminante.

Preparación de medio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*)

Se procedió a preparar medio BHI líquido para lo cual se pesó 9.4 gramos de medio BHI que se agregaron en una botella de vidrio limpia y se adicionó 250 ml de agua destilada. El medio fue autoclavado a 121°C durante 15 min. Transcurrido el tiempo fue retirado de la autoclave y controlado a temperatura ambiente durante 7 días para evitar contaminantes.

Cultivo de la cepas de *Streptococcus mutans*

Se utilizó cepas bacterianas de *Streptococcus mutans*, las cuales se obtuvieron del laboratorio Genlab del Perú S.A.C. (**Anexo 2**)

El cultivo de la cepa de *S. mutans* fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. Para lo cual se rompió la ampolla de la parte superior del tubo que contenía la cepa, se incubó 2 minutos para hidratar la bacteria y posteriormente con ayuda del hisopo se procedió a realizar estriado sobre la placa de agar TSA preparada anteriormente. Las placas de agar TSA que contenían la cepa fueron incubadas a 37°C, en condiciones de anaerobiosis controlada, durante 7 días. ⁽¹²⁾

Cultivo líquido de la cepas de *Streptococcus mutans*

Se utilizó el medio líquido BHI preparado anteriormente. Se colocó 3 ml de medio BHI líquido en tubos estériles de 15 ml y se adicionó una colonia del cultivo bacteriano de *S. mutans* del paso previo. Los tubos que contienen la colonia bacteriana en BHI fueron incubados a 37°C, en condiciones de anaerobiosis controlada durante 3 días.

Para los ensayos de inhibición se utilizó el cultivo bacteriano a la densidad patrón de 0,5 McFarland, lo que representa una concentración estimada de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. El patrón de McFarland se preparó inoculando colonias de la cepa de ensayo bacteriana en solución salina estéril y ajustando la densidad celular a la concentración especificada antes. ⁽¹³⁾

Análisis del efecto antibacteriano de los extractos metanólicos

Determinación de la actividad antibacteriana

Se procedió a pesar 10 gramos del medio de cultivo agar TSA y se adicionó en una botella de vidrio estéril y se adicionó de 250 ml de agua destilada, el contenido fue homogenizado y posteriormente autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

Transcurridos el tiempo, se retiraron con cuidado las botellas que contenían el agar TSA, cuando el medio alcanzó la temperatura de 55°C se procedió a adicionar 6 ml de medio de cultivo líquido de *Streptococcus mutans* posteriormente se procedió a verter 25 ml aproximadamente de la mezcla en placas Petri de 15 cm de diámetro, evitando generar burbujas. Una vez solidificada la muestra se procedió a determinar la actividad bacteriana.

La determinación de la actividad bacteriana se realizó con el método de difusión en pozo de Kirby-Bauer. ⁽¹⁴⁾ Esta consistió en realizar cinco perforaciones sobre la superficie del agar de las placas cultivadas con el microorganismo con el apoyo un sacabocado estéril teniendo 8 mm de diámetro y 4 mm de profundidad, luego en cada pozo se depositó 150 µl de cada extracto y clorhexidina al 0,12% como control positivo, estas placas fueron selladas con parafilm. Las muestras fueron incubadas a 37°C, en condiciones de anaerobiosis controlada durante 48 horas. Transcurrido el tiempo se procedió a medir los halos de inhibición con ayuda de un Vernier. ⁽¹⁵⁾ Se realizaron seis repeticiones por cada extracto metanólico.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB)

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida de los extractos utilizando el método de dilución en agar. ⁽¹⁶⁾

Los extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* se diluyeron de manera seriada: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 y 1:2048 que equivale a concentraciones de 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,312 µg/ml, 0,156 µg/ml, 0,078

$\mu\text{g/ml}$, 0,039 $\mu\text{g/ml}$, 0,019 $\mu\text{g/ml}$, 0,009 $\mu\text{g/ml}$ y 0,004 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. **(Anexo 3)**

En tubos de 1.5 ml estériles se adicionó 200 μl de cada una de las diluciones por separado, luego se adicionó 10 μl de la suspensión bacteriana de *S. mutans* a 0.5 escala de McFarland. Las muestras fueron incubadas a 37°C en condiciones de anaerobiosis controlada durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a plaquear la mezcla con ayuda de un asa de siembra en placas de agar TSA. Las placas fueron incubadas a 37°C en condiciones de anaerobiosis controlada durante 72 horas.

Finalmente, se procedió a realizar el conteo de unidades formadoras de colonias y se registró la CMI y CMB. ⁽¹⁷⁾

Determinación de la Citotoxicidad (CC50) de los extractos metanólicos.

La citotoxicidad se determinó con el método MTT, para lo cual se utilizó las células MDCK a una densidad de 1×10^4 células por pocillo, las células son incubadas en placas estériles de pocillo de 96 con 200 μl de medio DMEN suplementado, a 37°C en condiciones en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ -95% de aire, durante 24 horas. Luego se adicionó los extractos metanólicos diluidos en un rango de 0 a 1 000 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras fueron incubadas durante 6 días.

Los cultivos se incubaron a 37°C en condiciones en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ -95% de aire, durante 6 días. Como control positivo de viabilidad celular se utilizaron pocillos que contenían sólo células.

Transcurrido el tiempo, se añadió 20 μL de solución MTT (3 mg/mL diluido solución tamponada fosfato) a cada pocillo. Después de 3 horas, el medio se eliminó cuidadosamente y los cristales de Formazan se solubilizaron añadiendo 200 μl de dimetilsulfóxido (DMSO). Finalmente, la viabilidad celular se expresó como el porcentaje del valor de absorbancia determinado para los cultivos de control. La absorbancia (A570 nm) se midió en un lector de ELISA. CC50 se determinó utilizando el software Pharm / PCS. ^(18, 19)

5.5 Plan de análisis

En el análisis univariado se obtuvo la medida estadística descriptiva (media, mediana, mínimo, máximo y desviación estándar) de la variable dependiente efecto antibacteriano según los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*. Asimismo, se procedió a elaborar un gráfico de caja y bigote para la variable principal del estudio según los grupos de estudio. (**Tabla 1 y Gráfico 1**)

Además, se determinó la distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk y si presenta homogeneidad de varianzas a partir de la prueba de Bartlett.

Para el análisis bivariado se utilizó la prueba ANOVA y para hallar la diferencia entre ellas se utilizó la prueba post hoc Bonferroni.

La base de datos se realizó en el programa Microsoft Excel y se analizaron los resultados mediante los paquetes estadísticos Stata® versión 12.0.

5.6 Consideraciones éticas

En este estudio se comparó la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans*, sin ninguna intervención de seres humanos y animales.

Se procedió a realizar una solicitud dirigida al Comité de Ética de la universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, para que se autorice la ejecución del proyecto. (**Anexo 4**)

CAPÍTULO 6. RESULTADOS

El presente estudio tuvo como objetivo la evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de cuatro algas marinas sobre las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™). La tabla 1, muestra el análisis estadístico descriptivo de los cuatro tipos de algas marinas utilizados sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™). EL extracto metanólico de *Lessonia trabeculata* muestra mayor efecto antibacteriano, observándose halos de inhibición de $18.1 \text{ mm} \pm 0.75 \text{ mm}$, seguido del extracto metanólico de *Macrocystis pyrifera* con halos de inhibición de $12.25 \text{ mm} \pm 0.69 \text{ mm}$. Mientras que los extractos *Chondracanthus chamissoi* ($9.32 \text{ mm} \pm 0.49 \text{ mm}$) y *Lessonia nigrescens* ($10.08 \text{ mm} \pm 0.46 \text{ mm}$) muestran un halo de inhibición menor. Por otro lado, al comparar el efecto antibacteriano de los cuatro extractos se utilizó la prueba Anova y se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas entre los cuatros extractos con un valor de $p = 0.0000$; mientras que la prueba Post Hoc Bonferroni muestra que hay diferencia estadísticamente significativa entre todos los extractos metanólicos excepto entre *Chondracanthus chamissoi* y *Lessonia nigrescens* ($p < 0.05$). (Tabla 1 y gráfico 1)

Al evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), se observa efecto antibacteriano y bactericida a menor concentración para el caso del extracto metanólico de *Lessonia trabeculata* (0.156 g/ml) y *Macrocystis pyrifera* (0.312 g/ml), mientras que para el caso de *Chondracanthus chamissoi* y *Lessonia nigrescens* se necesita una mayor concentración del extracto (1.25 g/ml). (Tabla 2)

Los resultados de viabilidad celular muestran que los extractos de de *Chondracanthus chamissoi* y *Macrocystis pyrifera* tienen una citotoxicidad del 16% y 21% respectivamente. Dichos extractos son menos tóxicos que los extractos de *Lessonia trabeculata* y *Lessonia nigrescens* que muestran una citotoxicidad de 34% y 35% respectivamente. (Tabla 3 y gráfico 1)

TABLA 1

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)

Microorganismo	Grupos	Media (mm)	Mediana (mm)	Desviación Estándar	Mín (mm)	Máx (mm)	p**
	<i>Lessonia trabeculata</i> ^a	18,16	18	0,75	17,5	18,5	
	<i>Macrocystis pyrifera</i> ^b	12,25	12,5	0,69	11,5	12,75	
<i>Streptococcus Mutans</i>	<i>Chondracanthus chamissoi</i> ^c	9,325	9,5	0,49	8,95	9,75	0,0000
	<i>Lessonia nigrescens</i> ^c	10,08	10	0,46	9,75	10,5	
	Clorhexidina al 0,12%	44,25	44,75	1,36	44,5	45	---

Mediciones en mm

** Prueba ANOVA

Nivel de significancia estadística (p<0.05)

Las letras diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa

GRÁFICO 1

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)

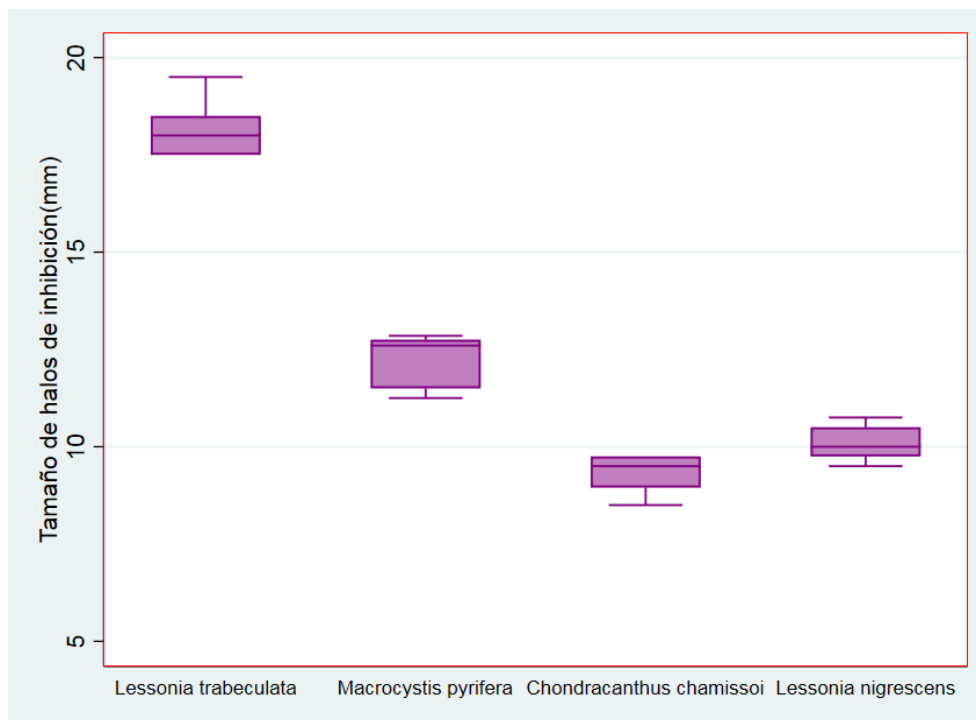


TABLA 2

Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida de los extractos metanólicos de las algas marinas sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™)

Microorganismo	Grupo	Concentración (µg/ml)											
		(10)	(5)	(2,5)	(1,25)	(0,625)	(0,312)	(0,156)	(0,0789)	(0,039)	(0,019)	(0,009)	(0,004)
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lessonia trabeculata</i>	+	+	+	+	+	+	CMI/CMB	-	-	-	-	-
	<i>Macrocystis pyrifera</i>	+	+	+	+	+	CMI/CMB	-	-	-	-	-	-
	<i>Chondracanthus chamissoi</i>	+	+	+	CMI/CMB	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Lessonia nigrescens</i>	+	+	+	CMI/CMB	-	-	-	-	-	-	-	-

*CMI: Concentración mínima inhibitoria

*CMB: Concentración mínima bactericida

(+) Si hay efecto bactericida

(-) No hay efecto bactericida

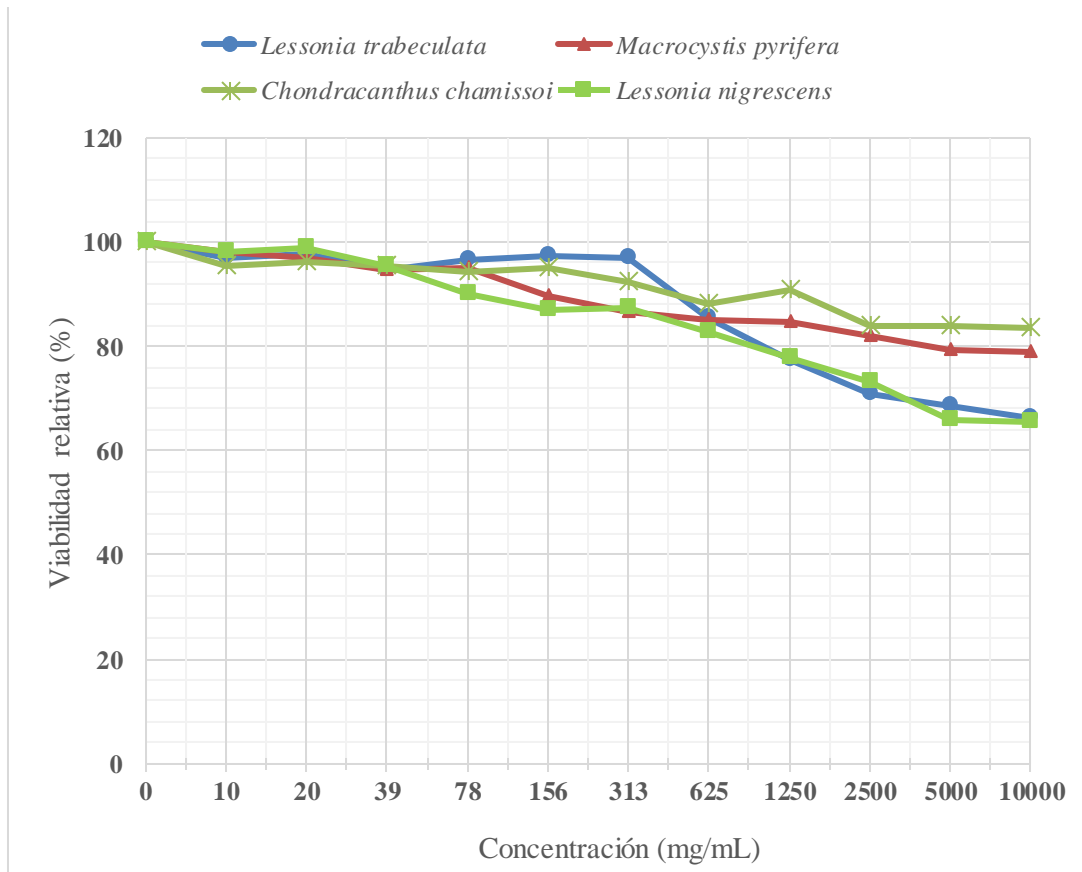
TABLA 3

Evaluación de la viabilidad celular de las células MTT frente a los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*

Concentraciones (mg/mL)	Viabilidad relativa (%)			
	<i>Lessonia trabeculata</i>	<i>Macrocystis pyrifera</i>	<i>Chondracanthus chamissoi</i>	<i>Lessonia nigrescens</i>
0	100	100	100	100
10	97	98	95	98
20	98	97	96	99
39	95	94	95	95
78	96	95	94	90
156	97	90	95	87
313	97	87	92	87
625	86	85	88	83
1250	77	85	91	78
2500	71	82	84	73
5000	69	79	84	66
10000	66	79	84	65

GRÁFICO 2

Evaluación de la viabilidad relativa de las células MTT frente a los extractos metanólicos de las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*



CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

La fitoterapia es una ciencia que busca crear nuevas alternativas en base a plantas para contrarrestar enfermedades, es así, como surge la idea de investigar cuatro algas marinas de fácil accesibilidad del litoral peruano como: *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*, con el objetivo de crear insumos odontológicos que puedan contrarrestar la actividad antibacteriana a través de enjuagues bucales y pastas dentales.

Para la preparación del extracto utilizado en el presente estudio, se utilizó como solvente el metanol, el cual es ideal para disolver componentes de algas ya que al ser más puro extrae mejor los compuestos de los extractos, como los fenoles y polifenoles, esto ha sido demostrado por Manivannan K. et al, quien indica que la actividad antibacteriana más fuerte exhibida por sus extractos fue el que utilizó como solvente el metanol a comparación de otros como el etanol, acetona, etil acetona o éter.⁽²⁰⁾

Uno de los procedimientos para evaluar actividad antibacteriana fue el método de difusión en pozo de Kirby-Bauer, el cual consiste en realizar perforaciones llamados pozos sobre las placas y colocar los extractos de las algas en cada uno de ellos. Este método ha sido utilizado de manera muy eficaz y segura en diversas investigaciones previas que evalúan la actividad antibacteriana de diferentes cepas ⁽²¹⁻²⁴⁾. Rojas. et al, señala que existe una diferencia significativa con el método de difusión en discos de papel y la técnica de Kirby-Bauer, la cual concentra una mayor cantidad del extracto, facilitando la evaluación del potencial antibacteriano⁽²⁵⁾, por este motivo este método ha sido utilizado para el desarrollo del presente estudio.

Para evaluar la citotoxicidad de los extractos frente a las células de la cavidad oral, se utilizó el método MTT, el cual nos permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas ⁽²⁶⁾. Este método es citado en numerosos estudios *in vitro* como el de Chia Y. et al, el cual demuestra que las fracciones parcialmente purificadas de los extractos de tres especies de algas mostraron una mayor actividad citotóxica que los extractos completos según el ensayo de MTT ⁽²⁷⁻²⁹⁾, lo cual hace que este método sea el más utilizado para la evaluación de la viabilidad celular.

Los resultados del presente estudio permiten evidenciar que existe mayor actividad antibacteriana en las algas *Macrocystis pyrifera* y *Lessonia trabeculata* sobre las cepas de *S. mutans* a comparación de la *Lessonia nigrescens* y *Chondracantus chamissoi*. Este hallazgo apoya el resultado de Jiménez E. et al, el cual demostró que los extractos etanólicos de las algas *Lessonia trabeculata* y *Macrocystis pyrifera* presentan actividad antimicrobiana. ⁽³⁰⁾ Asimismo Espeche. et al, realizó la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Macrocystis pyrifera* contra la bacteria *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* observando un halo de inhibición de 19 mm y 11 mm respectivamente.⁽³¹⁾ Es importante mencionar que, las algas estudiadas en la presente investigación, pertenecen al género Phaeophyta, las cuales son consideradas como algas pardas; estudios recientes demuestran que el efecto antibacteriano que poseen es atribuido a los compuestos, como el fucoidano. Este tiene como mecanismo de acción la alteración de la pared celular y membrana citoplasmática bacteriana, ocasionada por la unión del polisacárido a receptores de glicoproteína en la superficie celular, hecho que desencadena la ruptura de la membrana y la fuga de material citoplasmático. También, se ha asociado a la ruptura del ADN bacteriano debido a la unión de este con el polisacárido algal. ⁽³²⁾ Según Alghazeer. et al, el género Phaeophyta a comparación de los géneros Chlorophyta y Rhodophyta, es el que posee mayor actividad antibacteriana. ⁽³³⁻³⁵⁾ Sin embargo, cabe resaltar que las algas marinas estudiadas en esta investigación no presentan un mayor efecto antibacteriano que el compuesto químico Clorhexidina, siendo este considerado como el antiséptico ideal estándar por su acción antimicrobiana superior a los otros. ⁽³⁶⁾

Por otra parte, los extractos metanólicos de las cuatro algas marinas presentan actividad citotóxica baja, estos resultados son similares a los encontrados por Mayer. et al, el cual realizó el ensayo de citotoxicidad del extracto de la *Macrocystis pyrifera* demostrando que no presenta efecto citotóxico. ⁽³⁷⁾ Mayer et al, evidenció que cuando las concentraciones de los extractos de las algas aumentaban, la viabilidad celular disminuía; lo mismo se observó en los estudio de Vasudeva B. et al, donde se analizó la citotoxicidad de los extractos metanólicos de las algas *Ulothrixflacca*, *Ulva fasciata* y *Caulerpataxifolia*⁽³⁸⁾, y en el estudio de Mary J. et al, se analizó la citotoxicidad de los extractos etanólicos de la alga *Sargassum*. ⁽³⁹⁾

La importancia del estudio fue evaluar el efecto antibacteriano de cuatro algas marinas del litoral del mar peruano con la finalidad de contribuir en el futuro con la creación de

insumos que tengan como objetivo la prevención de la caries dental como colutorios o pastas dentales, de tal forma que disminuya el riesgo de caries en el Perú. Sin embargo, las propiedades biológicas de estas algas dependen en gran medida de su composición individual, por lo que amerita realizarse mayores estudios que complementen la información brindada como la caracterización química y estructural, el mecanismo de acción y el principio activo que permita que tenga efecto antibacteriano frente al microorganismo evaluado. Asimismo, se debe considerar que la actividad antimicrobiana de las algas puede ser afectada por ciertos factores como el hábitat, la temporada de colecta, los diferentes estadios de desarrollo de la planta, por tal motivo es recomendable la realización de estudios orientados a investigar especies de algas peruanas que posean componentes responsables de propiedades medicinales.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

1. Las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* presentan efecto antibacteriano contra la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC®35668™).
2. Al comparar el efecto bacteriano de los cuatro extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*, se halló que existe diferencia estadísticamente significativa entre los extractos metanólicos.
3. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto metanólico de *Lessonia trabeculata* fue de 0.156 g/ml y de *Macrocystis pyrifera* fue de 0.312 g/ml. Sin embargo, en los extractos de *Chondracanthus chamissoi* y *Lessonia nigrescens* la concentración fue de 1.25 g/ml.
4. Se determinó que las algas marinas *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi* presentan bajo efecto citotóxico a altas concentraciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lin NJ. Biofilm over teeth and restorations: What do we need to know? *Dent Mater.* 2017; 33(6):667-80.
2. Ito T, Ichinosawa T, Shimizu T. Streptococcal adhesin SspA/B analogue peptide inhibits adherence and impacts biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE.* 2017; 12(4):1-15.
3. Mok SF. et al. The oral microbiome community variations associated with normal, potentially malignant disorders and malignant lesions of the oral cavity. 2017; 39(1):1-15.
4. Ojeda JC, Oviedo E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES odontol.* 2013; 26(1): 44-56.
5. Romero A, Ruano R, Rivas P, Veintimilla S, Bailon M. Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *Eur J Med Chem.* 2017; 129(1):209-17.
6. Soares, Kleryzon. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. *Rev. Saúde Públ.* 2010; 4(1):3-7.
7. Frikha F, et al. Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Ciencias Marinas.* 2011; 37(2):113–24.
8. Diagnóstico y estado de la macroalga parda aracanto *Lessonia nigrescens* en el litoral de Arequipa-Perú. *IMARPE.* 2011; 38(4):429-40.
9. Guía de Práctica Clínica para la Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Caries Dental en Niñas y Niños. Gobierno de Perú [Internet]. Lima, Perú: Ministerio de Salud [citado el 1 jul. De 2018].

10. Estrategias Sanitarias – Salud Bucal. Gobierno de Perú [Internet].Lima, Perú: Ministerio de Salud [citado el 6 Jun del 2018].
11. Del Valle Mendoza J, Pumarola T, Gonzales LA, Del Valle LJ. Antiviral activity of maca (*Lepidium meyenii*) against human influenza virus. Asian Pac J Trop Med. 2014; 7(1): 415-20.
12. Colarossi R et al. Antibacterial activity of *Myrciaria dubia* (Camu camu) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*.Asian Pac J Trop Biomed. 2016; 6(9):740-44.
13. Andrews JM, Howe RA. BSAC Working Party on Susceptibility Testing. BSAC standardized disc susceptibility testing method. J Antimicrob Chemother. 2011; 66(12): 2726-57.
14. Sánchez E, Castillo S, García P. Actividad antimicrobiana. Investigación en plantas de importancia médica. 1ra ed. Barcelona, España: OmniaScience. 2016; 450 p.
15. Ballester C, Sendra E, Fernández J, Viuda M. Evaluation of the antibacterial and antioxidant activities of chitosan edible films incorporated with organic essential oils obtained from four Thymus species. J Food Sci Technol. 2016; 53(8):3374-79.
16. Medina-Flores D, et al. Antibacterial activity of *Bixa orellana* L. (achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. Asian Pac J Trop Biomed. 2016; 6(5):400–40.
17. Ponmurugan K, Muhammed M. Antibacterial and antioxidant activities of *Musa* sp. leaf extracts against multidrug resistant clinical pathogens causing nosocomial infection .Asian Pac J Trop Biomed. 2013; 3(9):737-42.

18. Corrales L, Castillo A, Melo A. Evaluación del potencial antibacterial *in vitro* de *Croton Lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. NOVA. 2013; 11(19):52-63.
19. Martínez AC, Uscanga AC, Rodríguez C. Actividad citotóxica *in vitro* frente a células tumorales. Investigación en plantas de importancia médica. 1ra ed. Barcelona. España: OmniaScience. 2016, 450 p.
20. Manivannan K, Karthikai devi G, Anantharaman P, Balasubramanian T. Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar. Asian Pac J Trop Biomed. 2011; 1(2): 114-20.
21. Zehra A, Naqvi SBS, Ali SQ. *In Vitro* Evaluation of Antimicrobial Effect of Extracts of Medicinal Plant's Leaves. J Med Microb Diagn. 2016; 5(3):1-14
22. Majji I, Battu G, Jangiti R, Talluri M. Evaluation of *in vitro* antibacterial activity of *Cassia siamealeaves*. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5(3):263-65.
23. Camere R, Ulloa G, Medina D, Caballero S, Mayta F, Valle J. Antibacterial activity of *Myrciaria dubia* (Camu camu) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguine*. Asian Pac J Trop Biomed. 2016; 6(9): 740–44.
24. Demetrio L. Valle Jr. et al. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5(7): 532–40.
25. Rojas JJ, García AM, López AJ. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Rev. Blacpma. 2005; 4(2):28-32.
26. Rivas C, Oranday M, Verde M. Investigación en plantas de importancia médica. 1era ed. España: OmniaScience; 2016. 450p.

27. Chia et al. Antioxidant and cytotoxic activities of three species of tropical seaweeds. *BMC Complement Altern Med.* 2015; 15(1):339.
28. Gunasekaran et al. Screening of *in vitro* cytotoxic activity of brown seaweeds against hepatocellular carcinoma. *J Appl Pharm Sci.* 2017; 7(5):51-55.
29. Mashjoor S. Yousefzadi M. Esmaili M. Rafiee R. Cytotoxicity and antimicrobial activity of marine macro algae (*Dictyotaceae* and *Ulvaceae*) from the Persian Gul. *Cytotechnology.* 2016; 68(1):1717–26.
30. Jiménez E. Dorta F. Medina C. Ramírez A. Ramírez I. Peña H. Anti-Phytopathogenic Activities of Macro-Algae Extracts. *Mar. Drugs.* 2011; 9(5):739-756.
31. Espechel M, Frailer E, Mayer A. Screening of Argentine marine algae for antimicrobial activity. *Hydrobiologia.* 1984;116(1):525-28.
32. He F, Yang Y, Yang G, Yu L. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control.* 2010; 21(9):1257–1262.
33. Alghazeer R, Whida F, Abduelrhman E, Gammoudi F, Azwai S. Screening of antibacterial activity in marine green, red and brown macroalgae from the western coast of Libya. *SciRes.* 2013; 5(1):7-14.
34. Tajbakhsh S. Antibacterial effect of the brown alga *Cystoseira trinodis*. *J Med Plant Res.* 2011; 5(18):4654-57.
35. Kausalya M, Narasimha G. Antimicrobial activity of marine algae. *J. Algal Biomass Util.* 2015; 6(1):78- 87.
36. Almohefer SA, Levon JA, Gregory RL, Eckert GJ, Lippert F. Caries lesion remineralization with fluoride toothpastes and chlorhexidine - effects of application timing and toothpaste surfactant. *J Appl Oral Sci.* 2018; 26(1):1-8.

37. Mayerl A, et al. Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. I. Antitumor, cytotoxicity and humoral immune response. *Hydrobiologia*.1987; 151(1):483-89.
38. Vasudeva B. Boominathan B. Cytotoxic effect of methanol extracts of seaweeds. *Int J Pharm Bio Sci*. 2016; 7(1):98-105.
39. Stella M, Vinotha P, Pradeep A. Screening for in vitro Cytotoxic Activity of Seaweed, *Sargassum* sp. Against Hep-2 and MCF-7 Cancer Cell Lines. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2012; 13 (12):6073-76.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXOS

Anexo 1

Extractos metanólicos de algas marinas

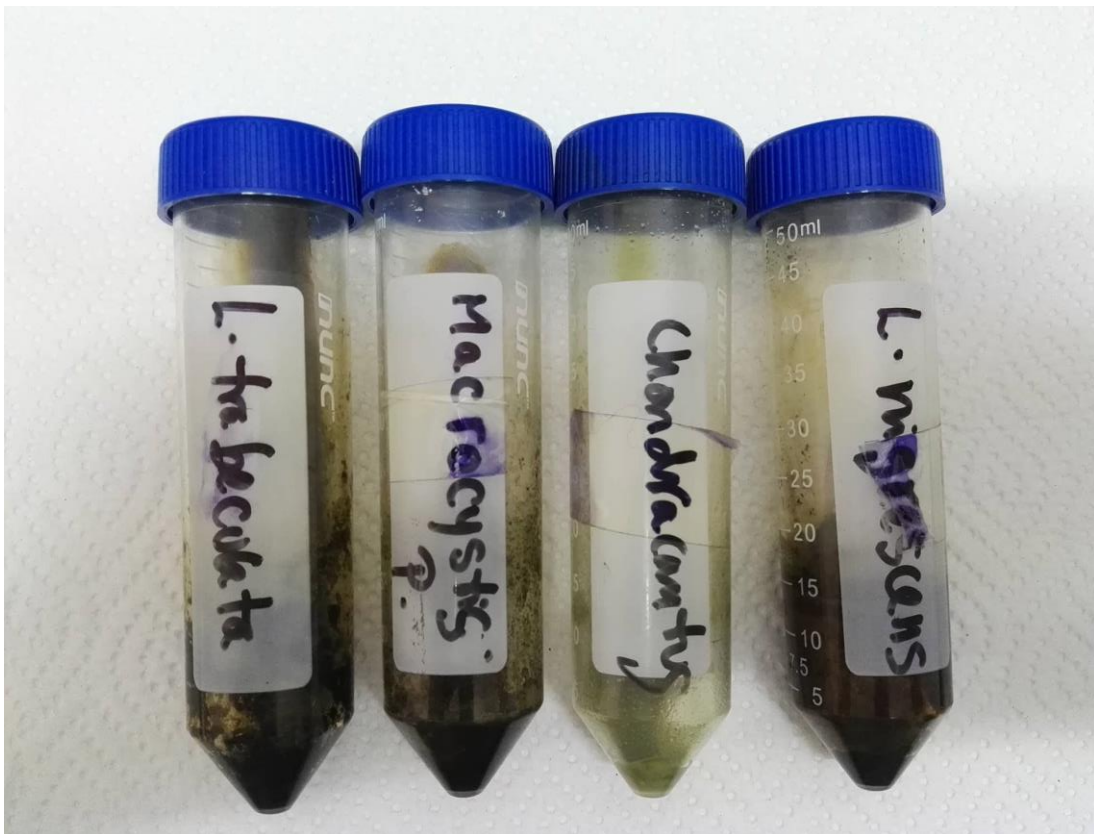


Fig.1. Extractos metanólicos de *Macrocystis pyrifera*, *Lessonia trabeculata*, *Lessonia nigrescens* y *Chondracanthus chamissoi*



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Anexo 2

Cultivo de cepas de *Streptococcus mutans*

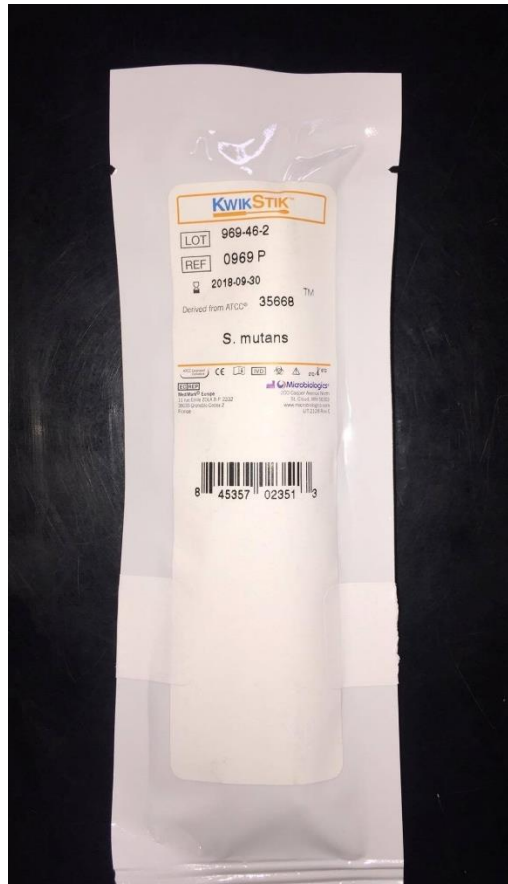


Fig.2. Cepas de *Streptococcus mutans*



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

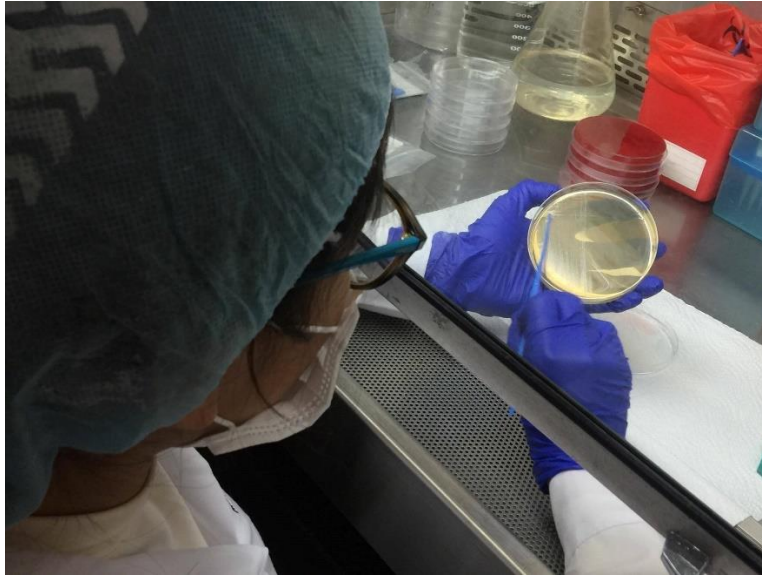


Fig.3. Estriado sobre la placa de agar TSA



Fig.4. Iniciando el proceso de incubación



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Anexo 3

Microdiluciones de los extractos metanólicos

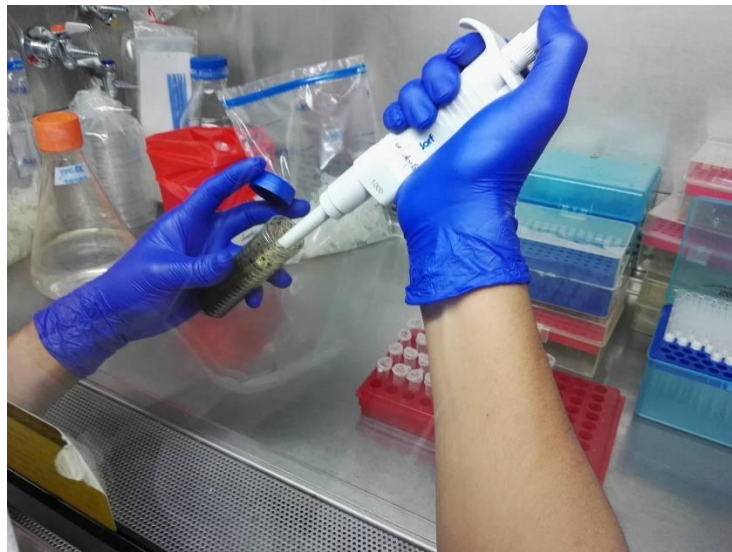


Fig.5. Preparación de microdiluciones

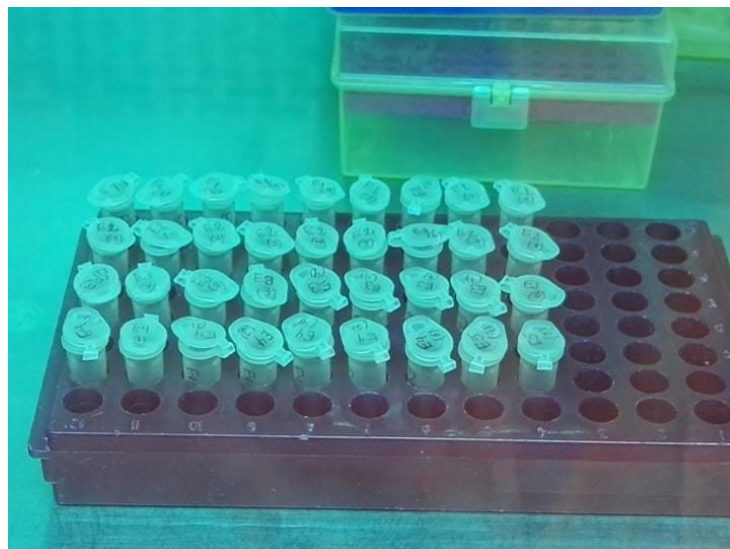


Fig.6. Microdiluciones



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Anexo 4

Carta de exoneración de comité de ética

CEI/061-06-17	
Chorrillos, 23 de junio del 2017	LUPC Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas Avenida Alameda San Marcos cuadra 2 Chorrillos Lima 9 - Perú T 511 313 3333 www.upc.edu.pe exigete, innova
Alumnas Maryori Cavero Tasayco Gianella Angeles Bonelli Alumnas de la Carrera de Odontología Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas <u>Presente.-</u>	
Ref: <u>P1105-17: Evaluación In Vitro del efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de las algas marinas sobre cepas de Streptococcus Mutans (ATCC R 35668 TM)</u>	
Hemos recibido el protocolo y los documentos acompañantes del proyecto titulado "ABC", los cuales han sido revisados en detalle. Luego de nuestra revisión, concluimos que esta investigación queda EXONERADA (EXENTA) DE REVISION adicional por parte del Comité de Ética e Investigación (CEI) de la Facultad de Ciencias de la Salud. Esta determinación se basa en lo establecido en el reglamento del Comité.	
De acuerdo a lo declarado en el protocolo en mención, y según lo establecido en el reglamento, el CEI da por sentado que el estudio no implica ninguno de los siguientes:	
<ul style="list-style-type: none">• Recolección activa de datos, bajo cualquier metodología, a partir de seres humanos vivos, animales vivos, ni de cualquier especie viva de fauna o flora silvestre en situación de amenaza o extinción.• Evaluación de especímenes biológicos procedentes de seres humanos o animales (Por ejemplo: suero, plasma, sangre total, líquido cefalorraquídeo, otros fluidos biológicos, tejidos, células, placenta y amnios, otros tipos de tejidos y células, orina, heces, sudor, otros tipo de secreciones y excreciones, cabello y otras faneras, piezas dentales parciales o totales o cualquier otro de origen orgánico o inorgánico procedente de un ser vivo), que serán o que han sido recolectados, recogidos, extraídos, almacenados, preservados y/o pre-tratados/pre-manipulados con fines de investigación, sin contar con las autorizaciones y consentimientos correspondientes, debidamente documentados, además de accesibles y disponibles a solicitud de este Comité en cualquier momento (Por ejemplo: la autorización y consentimiento de un sujeto para preservar sus especímenes biológicos con fines de investigación, la aprobación previa de un comité de ética en investigación para seres humanos o animales que contemple estos procesos, o el dictamen emitido por una instancia equivalente, etc.).	
Adicionalmente, los investigadores deben de informar al Comité sobre cualquier cambio en el protocolo posterior a este dictamen. Del mismo modo, de forma anual y desde esta fecha, los investigadores deben enviar un breve informe de avances al Comité y un breve informe final al momento del cierre definitivo del estudio. El comité se reserva el derecho de supervisar de manera inopinada la progresión de la investigación en cualquier momento y bajo cualquier modalidad.	
Sin otro particular quedo de ustedes Atentamente.	
 Edhy Segura Pauzar, Presidente del Comité de Ética Facultad de Ciencias de la Salud	