



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
ESTOMATOLOGÍA**

**TESIS**

**COMPARACIÓN DEL EFECTO  
ANTIBACTERIANO, *IN VITRO*, ENTRE  
MUESTRAS DE MIEL DE *Apis mellifera*  
PRODUCIDA EN LA COSTA, SIERRA Y SELVA  
DEL PERÚ, CONTRA *Streptococcus mutans* ATCC  
25175**

**PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO  
DENTISTA**

**Autor (es):**

**SILVA CORONEL FRANCO RUBEN**

**Asesora:**

**Dra. La Serna Solari Paola Beatriz**

**Línea de Investigación:**

**Respuestas biológicas aplicadas en terapias  
estomatológicas**

**Pimentel – Perú**

**2018**

**COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO, *IN VITRO*, ENTRE MUESTRAS DE MIEL DE *Apis mellifera* PRODUCIDA EN LA COSTA, SIERRA Y SELVA DEL PERÚ, CONTRA *Streptococcus mutans* ATCC 25175**

Aprobación de informe de investigación

---

**Dra. Paola Beatriz La Serna Solari**  
Asesora Metodóloga

---

**Dra. Marisel Roxana Valenzuela Ramos**  
Presidente del jurado de tesis

---

**Mg. Elmer López López**  
Secretario de jurado de tesis

---

**Mg. CD. Juan Pablo Portocarrero Mondragón**  
Vocal de jurado de tesis

## DEDICATORIA

A mi adorada Madre Marilú Coronel, por su inmenso y dedicado sacrificio que me sirven de ejemplo, para poder lograr mis metas trazadas.

A mi querido Padre Roberto Silva que me inculco los valores y la motivación para ser mejor persona, renegando por mis tropiezos, pero estuviste apoyándome siempre.

Muchas gracias papá

A mi hijo Mateo que es mi orgullo y mi gran motivación, quien libra mi mente de todas las adversidades que se presentan, y me impulsa a cada día superarme en la carrera.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi Asesora y profesora Cd. Paola La Serna Solari, quién me dio la confianza, al darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia, responsabilidad, por sus enseñanzas y sobre todo por compartir su tiempo para la culminación del presente trabajo.

El jurado integrado por la Dra. Marisel Valenzuela Ramos y Mg. Elmer López López y el Blgo Orlando Pérez Delgado, por sus correcciones oportunas y completa disposición en la evaluación del trabajo.

El profesor Orlando Pérez Delgado, por la orientación en la parte investigativa, y como ejemplo de imagen docente en sus enseñanzas en mi formación de académica.

Mis amigos, mi pareja Valexka Cornejo que, sin estar involucrados directamente, me dieron su apoyo para seguir adelante.

**Resumen:**

**Objetivo:** Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Costa, Sierra y Selva contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Material y métodos:** Se evaluó el efecto en 3 grupos distribuidos en concentraciones de 100 %, 50m% y 25 % para cada miel. Se hicieron 5 repeticiones por grupo experimental. La sensibilidad bacteriana se evaluó mediante el método de difusión en pozo. El espécimen bacteriano fue reactivado en caldo nutritivo, para inocularlo en cultivo Agar Cerebro Corazón. **Resultados:** Al enfrentar el microorganismo a las mieles de abeja, se obtuvo halos promedios de inhibición de 27.84 mm y 14,38 mm para las concentraciones de 100 % y 50 % de la miel de abeja de origen de sierra; **Conclusión:** sin embargo, las mieles de abeja de origen costa y selva no presentaron halos de inhibición. Se concluye que la miel de abeja de origen de Sierra al 100 % y 50 % tienen efecto antibacteriano sobre *S. mutans* ATCC 25175

**Palabras clave:** miel de abeja, *Apis mellifera*, *Streptococcus mutans* **Fuente:** DeCS BIREME)

**Abstract:**

**Objective:** To compare the in vitro antibacterial effect of samples of *Apis mellifera* honey produced in Costa, Sierra and Selva against *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Material and methods:** The effect was evaluated in 3 groups distributed in concentrations of 100%, 50m% and 25% for each honey. Five repetitions were made per experimental group. The bacterial sensitivity was evaluated by the well diffusion method. The bacterial specimen was reactivated in nutritious broth, to inoculate it in heart agar culture.

**Results:** When facing the microorganism to the honeys of bee, average halos were obtained of inhibition of 27.84 mm and 14.38 mm for the concentrations of 100% and 50% of the honey of bee of origin of saw; **Conclusion:**

nevertheless, bee honeys of coastal and jungle origin did not present inhibition halos. It is concluded that bee honey of Sierra origin at 100% and 50% have antibacterial effect on *S. mutans* ATCC 25175

**Keywords:** honey bee, *Apis mellifera*, *Streptococcus mutans* (Source: MeSH NLM)

## INDICE

### Resumen

### Abstract

<b>I.</b>	<b>Introducción</b> .....	1
1.1	Situación problema .....	1
1.2	Trabajos previos .....	3
1.3	Teorías relacionadas al tema .....	6
1.4	Formulación del problema .....	17
1.5	Justificación e importancia del estudio .....	17
1.6	Hipótesis .....	17
1.7	Objetivos .....	18
1.7.1	Objetivo General: .....	18
1.7.2	Objetivo Específicos: .....	18
<b>II.</b>	<b>Material y Métodos</b> .....	18
2.1	Tipo y Diseño de Investigación .....	18
2.2	Población y muestra .....	18
2.3	Variables, Operacionalización .....	18
2.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad. ....	19
2.4.1	Técnicas .....	19
2.4.2	Instrumento de recolección de datos .....	22
2.5	Métodos de análisis de datos. ....	22
2.6	Aspectos éticos. ....	22
<b>III.</b>	<b>Resultados</b> .....	23
3.1	De la Miel de Abeja .....	23
3.2	De la actividad antibacteriana .....	23
3.3	Discusión .....	24
<b>IV.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	26
	<b>Referencias</b> .....	27
	<b>Anexos</b> .....	30

## I. Introducción:

### 1.1 Situación problema:

La caries dental no puede desarrollarse sin la presencia de carbohidratos fermentables en la dieta, en particular azúcar. La susceptibilidad a desarrollar caries en presencia de carbohidratos puede verse influenciada por la genética y de los micronutrientes <sup>1</sup>, como también existen otros factores que pueden influenciar el desarrollo de caries como la higiene oral, a través de un estudio se evidencio para aquellos que tuvieron una higiene oral deficiente presentaron un promedio de  $3,1 \pm 2$  dientes cariados <sup>2</sup>.

A través de otros estudios demuestran que existe una relación significativa entre la actividad física y el comportamiento de higiene con el mantenimiento de la salud dental relacionado con el estado de la caries dental. Sin embargo, el comportamiento de comer frutas y verduras no tiene una relación significativa con el estado de la caries dental <sup>3</sup>. Además, otros estudios de estudiantes de un colegio militar revelaron que la prevalencia de caries fue del 61.2%. Los determinantes relacionados con la caries fueron: el consumo de azúcar entre las comidas (OR = 6.44 [3.4 - 11.9]); cepillado dental insuficiente (OR = 14.3 [8.8 - 23.29]); (OR = 3.84 [2.38 - 7.14]) y para visitas dentales regulares (OR = 5.26 [3.44 - 8.33]), con la última visita dental que data de hace más de un año<sup>4</sup>.

A través de técnicas de diagnóstico vanguardistas empleando secuencias de amplicones de ARNr 16S se identificaron de especies como *Streptococcus mutans* en todos los pacientes con caries, mientras que *Streptococcus sobrinus* solo se detectó en tres pacientes (abundancias relativas promedio 7,1% y 0,6%, respectivamente)<sup>5</sup>. Otros reportes la caries dental es una enfermedad que se caracteriza por la desmineralización del esmalte dental y está influenciado por los factores del huésped, la ingesta dietética, las bacterias cariogénicas *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* o *Streptococcus gordonii* <sup>6</sup>.

Por otro lado, la miel se ha utilizado ampliamente como agente de curación a lo largo de la historia de la humanidad, además de su uso generalizado como alimento popular. varios experimentos han determinado que la miel de abeja posee actividad antibacteriana *in vitro* frente a diferentes bacterias de importancia en salud, sin

embargo, su actividad depende tanto de la especie de animal, como del microorganismo evaluado, así se ha reportado que diferentes tipos de miel de abeja tienen efecto antibacteriano frente a bacterias gram positivas y gram negativas tales como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acetobacter baumani* como estreptococos  $\beta$ -hemolíticos del grupo A.<sup>7,8</sup>

Datos de la Organización Mundial de la Salud, reportan que el 60 a 90 % de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo<sup>9</sup>. 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<sup>10</sup>.

A través de programas preventivos, se orientado a controlar el aumento de prevalencia de caries, es así que estudios reportan que el empleo de barniz de flúor dos veces al año reduce la presencia de caries<sup>11</sup>, Por otro lado los aspectos específicos de los procesos cariosos en la dentición temporal son las complicaciones pulpares; la ingesta de carbohidratos es alta en los niños, y se favorece la presencia de la placa bacteriana, especialmente en las condiciones de mala higiene oral en los niños; la falta de información y educación de los padres con respecto a la importancia del tratamiento de caries dental en dientes temporales a menudo lleva al punto de un diente completamente irrecuperable<sup>12</sup>.

Inclusive la presencia de caries se ha visto influenciado por diferentes factores, como de origen microbiano, es así que un análisis del microbioma presente en la biopelículas dentales, reportan la presencia de *Streptococcus mutans* como bacterias predominantes<sup>6</sup>, como también se reportado asociado *Scardovia wiggisiae*, detectado en caries en modelo animal y capaz de producir ácido<sup>13</sup>.

Esto motivó a la formulación de la interrogante ¿Existe diferencia entre el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Costa, Sierra y Selva contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175? Siendo posible el efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175, pueda presentar con variaciones en sus concentraciones, se planteó el presente estudio cuyo objetivo es, Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Costa, Sierra y Selva contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175, esto por medio del método de difusión en pozo.

## 1.2 Trabajos Previos

Kalidasan G. (2017). En la presente investigación, se tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana de tres muestras diferentes de miel, a saber, miel Kombu, miel Malan y miel comercial contra bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acetobacter baumani*). Las muestras de miel natural y comercial seleccionadas para el presente estudio se obtuvieron de Chetheri Malai, Harur, Tamil Nadu, India. La miel de Kombu, miel de Malan y miel comercial mostraron la máxima zona de inhibición contra *Staphylococcus aureus*. En conclusión, la miel de Kombu exhibió una mayor actividad antimicrobiana contra los patógenos bacterianos en comparación con la miel de Malan y la miel comercial.<sup>7</sup>

Kotris, Talapko y Drenjančević (2017). El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de la miel de castaño y miel de acacia en diferentes concentraciones frente a aislados clínicos del grupo A de estreptococos hemolíticos (BHS-A). Los compuestos activos de la miel tienen múltiples efectos terapéuticos y se usan como medicina tradicional para el tratamiento y la prevención de diversas enfermedades. Los efectos antimicrobianos de dos mieles se probaron en cuarenta y cuatro cepas de BHS-A, aisladas de la garganta mediante un método de difusión de disco modificado. Una suspensión bacteriana de cepas BHS-A se plaqueó en agar Müller-Hinton con 5% de sangre de caballo desfibrinada. Utilizando un taladro de corcho estéril de 8 mm de diámetro, se cortaron pocillos en el agar y en cada uno se

introdujeron 100µL de las diferentes concentraciones de la solución de miel (25% v / v, 50% v / v, 75% v / v y 100% v / v). Se agregó un disco de penicilina como control positivo. Las placas se incubaron aeróbicamente durante 18-24 horas a 36 (± 1) ° C y se midieron las zonas de inhibición. El diámetro promedio de las zonas de inhibición de la miel de acacia (100% v / v) fue de 12.48 mm ± 1.73 mm, para la miel de acacia (75% v / v) fue de 11.06 mm ± 1.24 mm y para la miel de castaño (100 % v / v) fue de 11.08 mm ± 1.02 mm. El control positivo mostró un diámetro promedio de 30.45 mm ± 3.21 mm. Se observó significación estadística (p <0.05) al comparar los diámetros de zona de la miel de acacia (100%) y la penicilina antibiótica, y entre la miel de castaño de indias (100%) y la penicilina antibiótica. Las mieles de acacia y castaño de Indias exhiben actividad antibacteriana limitada pero efectiva sobre aislamientos clínicos de BHS-A<sup>8</sup>.

Rani, Budumuru y Bandaru (2017) La presente investigación tuvo como objetivo conocer la eficacia de la actividad antibacteriana de la miel disponible localmente contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (MSSA). Estudio prospectivo sobre la actividad antibacteriana de la miel pasteurizada multi floral Bharat disponible localmente en el estado de Andhra Pradesh. Además, se realizó y evaluó contra las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina. Su patrón de sensibilidad antibacteriana se probó usando la técnica de prueba de susceptibilidad a la difusión del disco Kirby-Bauer de CLSI junto con otros antimicrobianos de uso común. Tanto los aislamientos de MRSA como MSSA fueron sensibles a la miel. Sin embargo, el MRSA era resistente a todos los antimicrobianos probados excepto a linezolid, ya que como MSSA eran sensibles a todos excepto a la penicilina. Definitivamente vale la pena considerar la miel como un futuro prometedor antimicrobiano para ser probado y estudiado. La miel puede ser elaboradamente utilizada en el futuro con algunos estudios moleculares adicionales sobre su método de acción como agente antimicrobiano<sup>14</sup>.

Murugesan K *et al.* (2017) Se realizó un presente estudio con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana de diferentes tipos de miel contra los piogenos seleccionados. Se recolectaron miel monofloral, miel polifuncional, miel de bosque, miel comercial y se evaluaron organolépticamente. La actividad antibacteriana de la miel se determinó mediante un método de difusión en pocillo de agar contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* y mostró una mayor actividad antibacteriana con un

rango de zona de inhibición de aproximadamente 16-30 mm de diámetro. Al comparar cuatro muestras de miel, Polyfloral Honey tenía una mayor actividad antibacteriana<sup>15</sup>.

Wasihun y Kasa (2016). Realizaron una investigación con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana de la miel contra aislados bacterianos patógenos humanos resistentes a múltiples fármacos de infecciones de heridas y oídos. Se obtuvieron mieles rojas y blancas de tres distritos de la Zona Oriental de Tigray, a saber Temben, Atsbi y Samre. El potencial antibacteriano de estas mieles se determinó contra aislados multirresistentes de aislados clínicos de especies bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Streptococcus pyogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, y cinco controles bacterianos usando métodos de dilución de tubo. Se probaron diluciones seriadas y no diluidas de mieles para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando métodos de dilución de tubo de caldo mediante inspección visual y se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) subcultivando tubos que no mostraban signos visibles de crecimiento / turbidez en CMI. La CMI media de las mieles rojas para el control y las bacterias de prueba fue 7.7-8.9 y 12.6-17.9% (v/v) respectivamente. Mientras que la CMI de la miel blanca fue 12.2-12.5% (v/v) para el control y 16.1-27.7% (v/v) para las bacterias de prueba. La media de MBC de mieles rojas para el control y los aislados de prueba fue de 25-40 a 30.4-62.5% (v/v) respectivamente, y 40-55 y 60.7-75% (v/v) para las mieles blancas. La miel recolectada del área de Samre ha demostrado una mejor actividad antibacteriana que otros sitios. De forma similar, se descubrió que las mieles rojas de todas las áreas tienen una mejor actividad antibacteriana contra las bacterias multidrogas que la miel blanca. Sobre todos los CMI y CMB de todos los aislamientos estuvo entre 6.25-50 y 12.5-100% (v / v) respectivamente. La miel roja de todos los sitios mostró una mejor actividad antibacteriana que la miel blanca. Del mismo modo, la miel del área de Samre mostró una mejor actividad antibacteriana que los distritos de Temben y Atsbi. Todas las mieles recolectadas mostraron variadas actividades bacteriostáticas y bactericidas, y ninguno de los aislados fue resistente a las mieles probadas<sup>16</sup>.

Mshelia, Adeshina y Onaolapo (2017) Este estudio tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana de la miel y/o jugo de limón en las cepas de *Streptococcus*

*pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* de las infecciones del tracto respiratorio. La actividad antibacteriana de la miel y el zumo de limón, así como la de algunas formulaciones antibióticas estándar, se analizaron usando difusión en pocillo de agar y método de dilución de caldo. Se llevaron a cabo concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas. Por lo tanto, se obtuvieron zonas de inhibición (mm) que varían de 10-22 (100% de miel), 14-29 (100% de limón) y 20-29 (mezcla de jugo de miel / limón). Sin embargo, las concentraciones mínimas inhibitorias ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) varían entre 1.95-125 (Ceftriaxona), 1.56-NI (gentamicina), 31.5-NI (ácido amoxicilina-clavulánico), 0.98-62.5 (levofloxacin), 50.0-NI (azitromicina), 20.0-75.0 (miel 100% v / v), 22.5-47.5 (jugo de limón 100% v / v) y 17.5-25.0 (mezcla de jugo de miel y limón). Sin embargo, para la tasa de muerte, mezcla de jugo de miel/limón, el jugo de limón afectó la muerte completa a los 120 minutos; Mientras que, Ceftriaxona, Levofloxacin y Miel produjeron la muerte completa a los 1440 minutos. Por lo tanto, a partir de los hallazgos, la mezcla de jugo de miel / limón, jugo de limón, levofloxacin, ceftriaxona y gentamicina tuvieron una mayor actividad antibacteriana que la azitromicina, la amoxicilina-ácido clavulánico y la miel. Los aislados bacterianos fueron más susceptibles a la mezcla de jugo de miel / limón, jugo de limón, levofloxacin, ceftriaxona y gentamicina; pero menos susceptible a azitromicina, amoxicilina-ácido clavulánico y miel. Se observó una excelente actividad bactericida con la mezcla de jugo de miel y limón, jugo de limón en comparación con la miel sola <sup>17</sup>.

### **1.3 Teorías relacionadas al tema**

#### **Modelo Teórico Celular de *Streptococcus mutans***

La teoría celular propuesta por los alemanes Theodor Schwann y Matthias Schleiden, ha podido ayudar a la comprensión de los organismos y microorganismos con respecto a su morfología, fisiología y genética. Por tal motivo en el artículo consultado de *Streptococcus mutans* y caries dental de Ojeda, Oviedo y Salas<sup>18</sup>.

#### **Morfología y Fisiología de *Streptococcus mutans***

*Streptococcus mutans* es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa,

lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoniaco<sup>19</sup>.

Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente malfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas. *S. mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *S. mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. Aunque *S. mutans* no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes habitantes de campos de cultivo de caña de azúcar y de monos Rhesus. Igualmente, se ha aislado en ratas y hámsteres de experimentación<sup>18,19</sup>.

### **Caracterización microbiológica del *Streptococcus mutans***

En general, en la comunidad científica hay consenso en señalar al *S. mutans* como el microorganismo más importante en la caries dental. Por lo tanto, las estrategias de aislamiento, identificación, tipificación, prevención y control están dirigidas hacia este. El *S. mutans* es un coco grampositivo que fue aislado e identificado por Clarke, en 1924, a partir de lesiones cariosas en humanos. Lo denominó *S. mutans* por las formas mutantes en que se presenta: cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido y coco (forma redonda) en un medio alcalino.<sup>19</sup>

### **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 8 serotipos: *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k). Se sabe que el serotipo c de *S. mutans* es el tipo predominante en la cavidad oral humana más que las cepas e, d, f y k<sup>20</sup>.

Los polisacáridos de la pared celular juegan un papel importante en la colonización de sus nichos ecológicos. Las diferencias en las afinidades para la unión de los antígenos de polisacáridos a los tejidos humanos pueden ser la causa de esta distribución tan variada. Por otro lado, se cree que el progenitor de *S. mutans* haya sido el serotipo c y

que las cepas f y e pueden haberse originado por mutaciones del determinante del serotipo c<sup>21</sup>.

*Streptococcus mutans* generalmente es conocido como patógeno dental e igualmente se considera que causa bacteremia y endocarditis infecciosa. Previamente se ha clasificado en tres serotipos c, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos específicos de los serotipos los cuales están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Recientemente se designó una cepa de *S. mutans* con serotipo no c/e/f como serotipo k el cual se caracteriza por una drástica reducción en la cantidad de cadenas laterales de glucosa. Un rasgo biológico común del serotipo k es su bajo nivel de cariogenicidad debido a las alteraciones de varios de los mayores antígenos proteicos de superficie<sup>18,22</sup>.

En cuanto a la virulencia en sangre, estas cepas sobreviven en la sangre por mayor tiempo debido a su baja antigenicidad. Otros estudios revelan la participación de este serotipo en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, en la cuales se ha detectado su alta frecuencia<sup>22</sup>.

### **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 *S. 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 y la expresión de las características que puedan o no influenciar su capacidad de virulencia y su habilidad para sobrevivir bajo diferentes condiciones ambientales.

El papel de los estreptococos del grupo mutans, especialmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en la etiología de la caries dental ha sido extensamente investigado y claramente demostrado.<sup>20,21,22</sup>

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. Una característica importante de *S. mutans* es la persistencia de sus genotipos en la cavidad oral de adultos, adolescentes y niños mayores de cinco años<sup>18</sup>.

Este fenómeno es conocido como persistencia “intraindividual” 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. Hay dos factores que sugieren que *S. mutans* pueda aparecer durante la etapa pre dental: 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.<sup>23</sup>

Se han identificado unos 52 genotipos diferentes en niños pero las madres transmiten cerca de 16 de ellos. Se observa una tendencia hacia la estabilidad de los genotipos transmitidos por las madres, en parte, porque la colonización del genotipo materno pueda interferir con la colonización de otros genotipos. Se ha observado que los niños albergan de uno a cinco genotipos diferentes de *S. mutans* en diferentes edades. La diversidad genotípica de *S. mutans* en cuatro sitios de muestreo (saliva, dorso de la lengua, mucosa alveolar y biopelícula dental) de niños parece ser homogénea, sin embargo, la biopelícula dental es un lugar muy importante dado el gran número de genotipos de *S. mutans* y las cepas aisladas. Se ha demostrado un alto grado de homología entre cepas de *S. mutans* recuperadas de miembros de la misma familia indicando tanto la transmisión vertical y horizontal y una persistente colonización de *S. mutans* adquiridos previamente hasta la adultez temprana. La colonización inicial por *S. mutans* fue investigada en un estudio prospectivo de 46 niños estadounidenses

desde el nacimiento a 5 años de la edad cuyas madres portaban altos niveles de *S. mutans*. De aquel estudio, la ventana de infectividad fue definida como el período a partir de 19 a 31 meses de edad, cuando el riesgo de adquisición de *S. mutans* era alto<sup>23,24</sup>.

### **Adherencia de *Streptococcus mutans* y desarrollo inicial de la caries**

Las cepas de *S. mutans* son fenotípicamente homogéneas. Sin embargo, recientes investigaciones han revelado un gran nivel de la heterogeneidad serológica, genética y bioquímica de *S. mutans*. La heterogeneidad también se observa a nivel de enzimas producidas por las diferentes especies de *S. mutans* tales como las deshidrogenasas, glucosiltransferasas, aldolasas e invertasas. La serotipificación es un procedimiento rutinario y de mucho valor para determinar otros grupos inmunológicos y tipos de estreptococos<sup>18</sup>.

Las Gtfs también se adsorben a las superficies de otros microorganismos orales convirtiéndolos en productores de glucanos. *S. mutans* expresa 3 Gtfs genéticamente distintas; cada una parece desempeñar un papel diferente pero que se superpone en su papel en la formación de la placa virulenta. GtfC se adsorbe dentro de la película mientras que la GtfB se liga ávidamente a las bacterias promoviendo una apretada fusión celular incrementando la cohesión de la placa<sup>24</sup>.

La GtfD forma un polisacárido soluble, fácilmente metabolizable y sirve de iniciador de la GtfB. El comportamiento de Gtfs solubles no refleja lo observado con enzimas adsorbidas en la superficie.

Además, la estructura de la matriz de polisacárido cambia con el tiempo a consecuencia de la acción de mutanasas y dextranasas dentro de la placa.

Las Gtfs en diferentes lugares ofrecen blancos quimioterapéuticos para prevenir la caries dental. Sin embargo, los agentes que inhiben las Gtfs en solución, con frecuencia tienen efecto reducido o ninguno sobre las enzimas adsorbidas. Se han identificado otros productos bacterianos solubles usando técnicas inmunológicas, entre otros, fructosiltransferasa, Glucosiltransferasa (Gtf) y ácido lipoteicoico en la película formada in vitro e in vivo a partir de saliva entera. Se ha observado que las enzimas cuando se insolubilizan permanecen muy activas en una amplia gama de valores de pH. Está claro que la presencia de Gtf activa dentro de la película dental facilita la formación de glucanos in situ, proporcionando así, distintos sitios de unión para los microorganismos orales<sup>18,24</sup>.

## **Coagregación**

*Streptococcus mutans* tiene la capacidad de adherirse a superficies, establecer uniones con otros estreptococos y con bacterias de otras especies. Muchas cepas de *S. mutans* se aglutinan (adherencia homologa) por la adición de dextranos de alto peso molecular. También se ha reportado que ciertas cepas de *S. mutans* forman agregados con *Nocardia*, *Neisseria* al igual que con *Candida albicans* (adherencia heteróloga).

Estos procesos son complejos e implican una variedad de componentes bacterianos y de factores externos como la dieta especialmente el consumo de sacarosa que puede influir también en la proporción de las distintas especies bacterianas que constituyen la película, la cual es fermentada por *S. mutans* y *C. albicans*, produciendo un entorno acidogénico favorable para ambos<sup>18</sup>.

## **Susceptibilidad antimicrobiana en el *S. mutans***

Además de caries dental e infecciones piogénicas relacionadas, el *S. mutans* es un agente infeccioso muy importante en endocarditis. La participación de este microorganismo en infecciones orales y no orales ha generado interés por conocer su susceptibilidad a agentes antimicrobianos. Uno de los procedimientos más adecuados para ello es determinar la concentración mínima inhibitoria.

Los agentes antimicrobianos más utilizados son penicilina, amoxicilina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, imipenem y vancomicina. La CMI se hace utilizando el método de dilución en agar. A continuación se describe brevemente el protocolo: a) la CMI se hace con los antimicrobianos ya mencionados, en concentraciones entre 0,003 y 32 µg/ml (13,47); b) con un replicador, sobre el agar Wilkins-Chalgren se aplican suspensiones estandarizadas de 10.000 UFC/ml de la bacteria que se va a evaluar, y c) después de 48 h de incubación a 35 °C en atmósfera anaeróbica (H<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> 10:10:80), se determina la CMI de acuerdo con la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de la bacteria evaluada<sup>25</sup>.

## **Efecto de la sacarosa en los polisacáridos extracelulares (EPS).**

Cualquier carbohidrato que las bacterias de la placa dental puedan utilizar como fuente de energía contribuye más o menos a la virulencia de la microbiota y, por lo tanto, tiene un potencial cariogénico. La sacarosa no solo se fermenta rápidamente a

productos finales ácidos, sino que también es el único carbohidrato dietético que se puede transformar en EPS en la placa. Por lo tanto, se considera que es el carbohidrato más cariogénico en la dieta humana. La composición de carbohidratos de EPS puede variar dependiendo de las condiciones de crecimiento, siendo variables importantes el pH, la temperatura y la fuente de nitrógeno. La producción de EPS está principalmente asociada al crecimiento; por lo tanto, la mayor tasa de producción ocurre en condiciones óptimas para el crecimiento. El medio de brain heart infusion (BHI) ha demostrado ser el más efectivo con respecto a la producción de EPS<sup>20</sup>

### **Miel de abeja (*Apis mellifera*)**

#### **Definición**

La miel es un líquido viscoso y dulce, elaborado por las abejas a partir de néctar procedente fundamentalmente de las flores, el cual transporta las obreras a la colmena en su buche melarios y se almacena y madura en los panales constituyendo una reserva de alimentos<sup>26</sup>.

La Norma Técnica Peruana, la define como una sustancia dulce natural producida por las abejas obreras a partir del néctar de las flores, secreciones de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores de plantas que quedan sobre partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, almacenan y dejan en los panales para que madure y añeje<sup>26</sup>.

#### **Composición**

Dependiendo de la (s) fuente (s) de néctar, la miel puede tener una composición variable. La composición promedio de una muestra se enumera en la Tabla 1. El amplio rango de algunos componentes se debe a la gama igualmente amplia de fuentes de néctar. Las mieles de fuente única tendrán un rango inferior de valores debido a la mayor consistencia en la composición del néctar<sup>27</sup>.

La miel de abeja es un producto biológico muy complejo, cuya composición depende de diversos factores como son: La raza de abejas, el estado fisiológico de la colonia, la flora visitada, naturaleza del suelo, condiciones climáticas y edafológicas del lugar donde se produce.

La miel es esencialmente una disolución acuosa concentrada de azúcar invertido, contiene además una mezcla muy compleja de hidratos de carbono, diversas enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, sustancias aromáticas, pigmentos, ceras, granos de polen.<sup>28</sup>

**Tabla 1.** Composición química de la miel de abeja

Componente	Promedio (%)	Rango (%)
Agua	17,2	12,2 – 22,9
Fructosa	38,4	30,9 – 44,3
Glucosa	30,3	22,9 – 40,7
Sacarosa	1,3	0,2 – 7,6
Otros disacáridos	7,3	2,7 – 16
Azúcares más altos	1,4	0,1 – 3,8
Ácido glucónico	0,57	0,17 – 1,17
Ácidos (no incluye a. glucónico)	0,43	0,13 – 0,92
Lactonas	0,14	0 – 0,37
Minerales	0,17	0,02 – 1,03
Nitrógeno	0,04	0 – 0,13

Fuente: The Chemical Composition of Honey, Ball, 2007

Una de las características definitorias de la miel es su bajo contenido de humedad. El folclor dice que la miel es el único alimento que no se echará a perder. Esto se debe a su bajo contenido de humedad; bacterias, por ejemplo, no pueden sobrevivir en un medio con una presión osmótica tan alta. Sin embargo, esto no quiere decir que la miel no puede ser insegura. Puede estar hecho de néctar que no es apetecible o venenoso (como el del rododendro) o puede contener esporas de moho u otros organismos que pueden actuar como alérgenos o toxinas, razón por la cual no se debe alimentar a bebés menores de un año de edad. La miel que se cosecha antes de que esté completamente madura tiene un mayor contenido de humedad y puede ser vulnerable a la descomposición. Además, la miel es higroscópica y absorberá el agua de la atmósfera si no se guarda en un recipiente bien cerrado<sup>26,27</sup>.

La miel es típicamente alrededor de 83 grados Brix o alrededor del 83% de azúcar. (La unidad "grados Brix", abreviada °Bx, indica cuántos gramos de sacarosa se disuelven en 100 gramos de solución; es una unidad común que se usa para describir miel, jarabe de arce, jugo de uva en fermentación y jugo de naranja concentrado congelado. Aunque las concentraciones individuales típicas de azúcares están por debajo del límite de saturación individual (alrededor de 69 g/100 g H<sub>2</sub>O para glucosa y 380 g/100 g H<sub>2</sub>O para fructosa, la concentración total de azúcar es lo suficientemente alta como para considerar la miel una solución sobresaturada. De hecho, con el tiempo, la glucosa se precipitará de la solución, como confirmará un cuidador a largo plazo de la miel. La miel almacenada a bajas temperaturas también es propensa a la precipitación de glucosa<sup>28</sup>.

La mayoría de los carbohidratos en la miel son monosacáridos, con más fructosa que glucosa. En un tercer lugar distante está la sacarosa; otros disacáridos presentes en la miel, aunque en cantidades muy pequeñas, son maltosa, isomaltosa, nigerosa, turanosa y maltulosa. Aproximadamente el 1% o menos de los azúcares totales, una pequeña cantidad de azúcares superiores, oligosacáridos y dextrinas también están presentes en la miel. Curiosamente, el llamado espectro de azúcar de la miel terminada no es estático. Por el contrario, cambia con el tiempo. Una ligera disminución (<15%) en la cantidad de fructosa y glucosa ocurre con el tiempo debido a la formación acidificada de maltosa y otros disacáridos reductores<sup>26</sup>.

La miel es engañosamente ácida, ya que el alto contenido de azúcar tiende a enmascarar la acidez en el sabor. El pH promedio de la miel es 3,9; que es equivalente a una solución acuosa ~0.0001 M de un ácido monoprótico fuerte. Originalmente se pensó que los ácidos fórmico y cítrico eran los ácidos dominantes en las mieles<sup>26</sup>.

Sin embargo, ahora se entiende que el ácido glucónico (ácido 2,3,4,5,6-pentahidroxihexanoico) es el ácido predominante en la miel. Es producida por glucosa oxidasa a partir de secreciones de abejas que actúan sobre la glucosa.

El contenido mineral de la miel tiene un rango de valores de 50 veces, el más grande de cualquier componente. Los minerales encontrados en la miel, sus valores promedio y sus rangos se enumeran en la Tabla 2. Tenga en cuenta que según los estándares de

la FDA de EE. UU la mayoría de la miel se puede clasificar como un alimento bajo en sodio o libre de sodio. Los elementos traza encontrados en la miel incluyen cromo, litio, níquel, plomo, estaño y zinc<sup>26,28</sup>.

**Tabla 2.** Contenido mineral de la miel de color claro

Mineral	Promedio (ppm)	Rango (ppm)
Potasio	205	100 – 588
Sulfuro	58	36 – 108
Cloro	52	23 – 75
Calcio	49	23 – 68
Fosforo	35	23 – 50
Magnesio	19	11 – 56
Sodio	18	6 – 35
Hierro	2,4	1,2 – 4,8
Cobre	0,3	0,14 – 0,7
Minerales	0,17	0,02 – 1,03
Manganeso	0,3	0,17 – 0,44

Fuente: The Chemical Composition of Honey, Ball, 2007

Además de diastasa, invertasa y glucosa oxidasa, otras enzimas que se encuentran en la miel incluyen catalasa y una fosfatasa ácida. Solo hay una pequeña cantidad de proteína en la miel terminada, como lo indica el bajo contenido de nitrógeno en la Tabla 1. También hay aminoácidos libres en la miel, siendo la prolina el aminoácido dominante presente. En general, se acepta que la mayor parte del contenido de aminoácidos proviene de las abejas, no del néctar o el polen. El aminoácido total raramente excede 300 ppm.

La composición química de la miel afecta varias de sus características físicas. Como solución concentrada de azúcar, la miel tiene un alto índice de refracción (alrededor de 1.49) y viscosidad (la miel típica del trébol tiene una viscosidad de aproximadamente 120 poise a temperatura ambiente, en comparación con 0,0089 poise para el agua). La gravedad específica de la miel es de aproximadamente 1,4, y el calor específico de la

miel es aproximadamente un 40% menor que el del agua pura.<sup>26</sup>

El aroma y el sabor de la miel se atribuyen a los azúcares, los ácidos y otros componentes volátiles de la miel. Estos componentes volátiles incluyen una variedad de aldehídos y alcoholes C1-C5. El formiato de metilo y etilo también se han identificado en la miel. Se ha observado que muchos ésteres fenilacéticos tienen un sabor y aroma similar al de la miel.

**Tabla 3.** Contenido de vitamina en la miel

Vitamina	Concentración (ppm)
Rivoflavina	0,63
Ácido pantoténico	0,96
Niacina	3,2
Tiamina	0,06
Pirodoxina	3,2
Ácido Ascórbico	22

Fuente: The Chemical Composition of Honey, Ball, 2007

Una característica obvia de la miel es su color. La miel producida en serie es una mezcla hecha de muchas fuentes de miel, por lo que puede ser de color uniforme. Pero la miel cosechada individualmente puede tener una gama de colores dependiendo de la estación, la fuente de néctar, el tiempo entre la recolección de néctar y la cosecha de miel, y los detalles de producción (la calefacción tiene el impacto de color más obvio). La experiencia del autor con su propia colmena indica que el color de la miel en los panales cambia repentinamente de claro a oscuro en el medio del verano sin una transición gradual, obviamente causada por un cambio en las fuentes de néctar disponibles. Curiosamente, los productos químicos más responsables del color de la miel siguen siendo en gran parte desconocidos. Algunos investigadores sugieren que el color se debe a la presencia o ausencia de carotenoides; otros sugieren que los polifenoles son responsables. Otra posibilidad es una caramelización química de los sacáridos en la miel, catalizada por los ácidos presentes. Otros sugieren una reacción de Malliard entre los azúcares y los aminoácidos. Cualquiera sea la fuente del color,

generalmente es cierto que cuanto más oscura es la miel, más intenso es el sabor  
26,27,28

#### **1.4 Formulación del problema**

¿Existe diferencia entre el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Costa, Sierra y Selva contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175??

#### **1.5 Justificación e importancia del estudio**

El presente trabajo de investigación se justifica en los estudios que reportan de la prevalencia de caries y del empleo de diferentes alternativas terapéuticas para su control, inclusive se ve influenciado con la presencia de *Streptococcus mutans* como responsable del origen de las caries.

En relación a los tipos de miel de abeja, otros estudios han permitido reportar su capacidad inhibitoria sobre diferentes bacterias, asimismo no siempre los resultados de las investigaciones son coincidentes, lo que sugiere que existe una relación entre el efecto del tipo de miel de acuerdo a su origen y sus características físico químicas. En nuestro medio, existen escasos reportes de trabajos que revelen el efecto inhibitorio de la miel de abeja procedente de la costa, sierra y selva sobre *Streptococcus mutans*.

Esta situación motiva la ejecución del presente estudio cuyos resultados permitirán determinar si el tipo de miel de abeja *Apis mellifera*, tiene mayor efecto antibacteriano, dependiendo de su origen, teniendo con ello la posibilidad de incentivar otros estudios destinados a, demostrar el efecto inhibitorio sobre otros microorganismos tipo parásitos u hongos, a su uso en terapia o como desinfectante.

#### **1.6 Hipótesis**

Las muestras de miel de *Apis mellifera* producidas en la Costa, Sierra y Selva tiene igual efecto antibacteriano *in vitro* de contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

## 1.7 Objetivos

### 1.7.1 Objetivo General:

Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Costa, Sierra y Selva contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

### 1.7.2 Objetivo Específicos:

- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Costa, contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Sierra, contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de muestras de miel de *Apis mellifera* producida en la Selva, contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## II. Material y Métodos:

### 2.1 Tipo y Diseño de Investigación.

Para el presente proyecto de investigación se empleó el tipo de investigación cuantitativa, con diseño experimental de estímulo creciente<sup>29</sup>.

### 2.2 Población y muestra

Por no contar con una población finita, para el presente trabajo se obtuvo una muestra **no probabilística**, será calculada multiplicando el número de concentraciones, el número de tipos miel, el número de cepas, representado de la siguiente manera, 5 concentraciones de la miel, 3 tipos de miel, 1 cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, constituido por una muestra de 15 y, se realizarán 5 repeticiones, por lo tanto, se obtendrá 75 unidades experimentales.

## 2.3 Variables, Operacionalizacion

**Variable Independiente:** Miel de abeja *Apis mellifera*

**Variable Dependiente:** Efecto antibacteriano

Variables	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
<b>Variable Independiente:</b> Miel de Abeja <i>Apis mellifera</i>	Costa	Concentraciones del miel mg/mL	<b>Dilución doble seriada</b>
	Sierra		
	Selva		
<b>Variable Dependiente:</b> Efecto antibacteriano	Crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Zona o Halo de inhibición nula (-) menor o igual 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm sumamente sensible (S.S. = +++) si será igual o superior a 20 mm.	<b>Difusión en pozo</b>

## 2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

### 2.4.1 Técnicas

#### Difusión en pozo

Método de difusión en agar es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Con una variante al método kirby-bauer, para este método se emplea un sacabocado para realizar pozos en el agar<sup>30</sup>.

### **Colección de muestras de miel**

Se seleccionarán tres tipos diferentes de muestras de miel para el presente estudio (a) Miel de origen costeño, (b) miel de origen de sierra, (c) miel de origen de Selva, muestras comerciales.

### **2.5. Procedimientos de análisis d datos**

#### **Preparación del agente antibacteriano**

Siguiendo las recomendaciones del CLSI<sup>31</sup>, para evaluar la potencia puede expresarse como porcentaje o en unidades de  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ,  $\text{mg}/\text{mL}$ , (p/p).

- La miel fue recolectada con agua destilada, se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos.
- Las fracciones solubles de la miel se usaron para realizar las diluciones dobles seriadas, que en general se parte de una solución concentrada y se preparan series de diluciones al décimo (1:10) o al medio (1:2). De esta manera se obtiene una serie de soluciones relacionadas por ejemplo por un factor de dilución 10 es decir 1/10; 1/100; 1/1000 y así sucesivamente. y calcular las concentraciones expresadas en  $\text{mg}/\text{mL}$ .
- Luego se distribuyó en la placa de agar.

### **Actividad Antibacteriana**

#### **Preparación del inóculo**

Según las orientaciones de la Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>32</sup>.

#### **Colonias para el inóculo**

Las colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fueron seleccionadas de un cultivo en placa de agar Cerebro Corazón después de 18 a 24 horas<sup>32</sup>.

### **Preparación de la suspensión del inóculo.**

- De la placa de agar, se seleccionó de tres a cinco colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia se tocó con un asa y se transfirió a un tubo con 4-5 mL de caldo Müller-Hinton.
- Con ayuda del espectrofotómetro se midió turbidez equivalente a 0,5 del estándar de McFarland, con absorbancias de 0,08 – 0,1 para bacterias.
- La suspensión bacteriana resultante contiene aproximadamente  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  (UFC/mL).

### **De la Siembra**

- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, una torunda de algodón se sumerge en ella. La torunda debe ser rotada varias veces y presionada firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de agar Cerebro-Corazón por rayado con la torunda sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido rayando dos o más veces, rotando la placa aproximadamente  $60^\circ$  cada vez para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del agar.
- Las tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15 minutos, para permitir un exceso de humedad.

### **Método de difusión de pozo**

Sobre las placas sembradas:

- Se realizaron 6 perforaciones de 6 mm de diámetro, con un sacabocado.
- Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  en cada pozo, con ayuda de una micropipeta, las concentraciones de miel de abeja de origen costa, sierra y selva.
- Cada pozo fue marcado con su respectiva identificación, se sellará con parafilm y se incubará las placas a  $37^\circ\text{C}$ , por un periodo de 16 a 18 horas.

### **Lectura e interpretación de resultados**

- Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea

de crecimiento (Anexo n° 3).

- Los tamaños de las zonas de inhibición fueron medidos con un Vernier en milímetros y serán interpretados según orientaciones del CLSI (Clínical Laboratory Estándar Institute).
- La actividad se consideró en función al diámetro del HICM <sup>33</sup>:
  - nula (-) si será inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +)
  - 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm
  - sumamente sensible (S.S. = +++) si será igual o superior a 20 mm

### **2.5.2 Instrumento de recolección de datos**

Se empleó una ficha de recolección de datos, con la finalidad de determinar la sensibilidad de la miel de abeja a diferentes concentraciones, midiendo los halos inhibición de crecimiento bacteriano.

### **2.6 Aspectos éticos.**

Se considerarán aspectos de bioseguridad, con respecto a su inactivación de los medios con *Streptococcus mutans*, mediante autoclavado, con la finalidad de evitar su propagación, contacto con el personal de que labora en la Universidad.

### **2.7. Criterios de rigor científico**

#### **Confiabilidad**

Para la medición de los halos inhibición de crecimiento bacteriano, se empleará el calibre o pie de rey VERNIER, con la finalidad de reducir los errores de medida en milímetros (mm).

#### **Validez**

Para el presente estudio se tomará en cuenta la ficha de recolección de datos en relación a número de repetición, con la finalidad de tener una consistencia interna del efecto antibacteriano de la miel de abeja.

### III. Resultados:

#### 3.1. De la Miel de Abeja

Se obtuvo 1 mL de la fracción soluble de la miel de abeja de origen de Costa, Sierra y Selva, considerando frascos comerciales (Fig 1).

A través de la fracción soluble se realizó 2 diluciones doble seriadas, obteniendo concentraciones (V/V) al 100 %, 50 % y 25 % respectivamente para cada miel dependiendo de su origen (Fig 2).

#### 3.2. De la actividad antibacteriana

De acuerdo al promedio de las mediciones de los halos de inhibición de crecimiento microbiano, la miel de abeja comercial de origen de la Sierra presentó actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Tabla 1).

La miel de abeja comercial de la costa y selva no presento halos de inhibición de crecimiento antibacteriana contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (anexo 4)

**Tabla 1.** Comparación del efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Concentraciones	<i>Apis mellifera</i>		
	Costa	Sierra	Selva
100%	0	28.10	0
	0	27.40	0
	0	27.78	0
	0	28.12	0
	0	27.82	0

	0		14.46		0	
	0		14.82		0	
<b>50 %</b>	0		14.6		0	
	0		14.25		0	
	0		13.75		0	
	0	<i>Apis mellifera</i>			0	
	0		0		0	
<b>Concentraciones</b>		<b>Sierra</b>	0		0	
<b>25 %</b>	0	<b>Halo de inhibición (mm)</b>	0		0	<b>P</b>
	0		0		0	
	0		0		0	
<b>100%</b>	28.10	27.40	27.78	28.12	27.82	t = 60,06
<b>50 %</b>	14.46	14.82	14.6	14.25	13.75	P = 0,00

**Tabla 3:** Evaluación del efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* de origen de Sierra, contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

*Fuente: Datos proporcionados por el investigador*

*Fuente: Datos proporcionados por el investigador*

De acuerdo a la evaluación del efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* de origen sierra, presentó inhibición crecimiento a la concentración del 100 y 50 %, asimismo también se obtuvo las mediciones de los halos (Tabla 3), como también el resultado estadístico se comprobó la diferencia con la prueba t estudent (60,06) con un valor de P altamente significativo significancia (p = 0,000) y se verifica con d de cohen (1,89) cuya fuerza del efecto es mucho mayor que el típico (anexo 6).

### 3.3 Discusión:

La caries dental es un importante problema de salud pública a nivel mundial y es la enfermedad no transmisible más extendida (24), además que se sido considerado a *S. mutans*, durante mucho tiempo como uno de los principales patógenos orales y responsables de la caries, asimismo que forma glucanos y fructanos que promueven la colonización bacteriana y son factores clave la virulencia en la formación de caries dental (25).

En el presente estudio se evidenció que la miel de abeja *Apis mellifera* de origen de Sierra tuvo efecto antibacteriano a concentraciones del 100 % y 50 % respectivamente,

además que la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 resultó tener sensibilidad frente a la miel de abeja de origen de Sierra.

La miel de abeja *A. mellifera* de origen de Sierra presentaron diferentes diámetros del promedio de inhibición de crecimiento de 27.84 mm y 14,38 mm, además en otros estudios como Kotris, Talapko y Drenjančević revelaron la variabilidad del efecto antibacteriano de diferentes tipos de miel de abeja con respecto a su origen, obteniendo zonas de inhibición de 12,48 mm, 11,06 mm, 11,08 mm. Esta diferencia se demuestra que las mieles de abeja presentan una variabilidad dependiendo del origen de su cosecha. (8). Además otros autores como Kalidasan *et al.*, compararon el efecto antibacteriano de muestras de miel natural y comercial contra bacterias patógenas indistintamente de *Streptococcus mutans*, obtuvieron mayor actividad antibacteriana en miel natural que miel comercial presentando zonas de inhibición de 26 mm y 22 mm para *Staphylococcus aureus* (7).

La investigación demostró que la miel de abeja comercial de origen de costa y selva, no registraron actividad antibacteriana alguna en comparación a la miel de abeja natural de origen de sierra, corroborando con otros estudios, se concluye que no son coincidentes, otros autores como Rani, Budumuru y Banduru, demostraron la capacidad antibacteriana de la miel de abeja contra bacterias metilino resistentes y metilino sensibles mostrando una zona de inhibición de 36,2 mm y 46,16 mm respectivamente (14), por otro lado Murugesan K *et al.* compararon el efecto antibacteriano de tres mieles naturales y una miel de abeja comercial, obtuvieron rangos de inhibición de 16 a 30 mm, todas las mieles evaluadas presentaron efecto antibacteriano (15).

Complementando el estudio, otros autores también demostraron el efecto antibacteriano de la miel de abeja, tal como Wasihun y Kasa, evidenciaron el potencial antibacteriano frente a bacterias multirresistentes, demostrando su actividad bacteriostática y bactericida (16), asimismo Mshelia, Adeshina y Onaolapo demostraron también la actividad antibacteriana de la miel de abeja de manera sinérgica con el jugo de limón e independiente obteniendo como hallazgo su capacidad bactericida (17).

Con el presente estudio se puede corroborar que la miel de abeja puede contribuir en el control del crecimiento de *Streptococcus mutans*, dependiendo de su origen natural o comercial y la región de cosecha.

#### **IV. Conclusiones:**

Se concluye que:

- Los resultados del estudio comparativo demostraron, que la miel de abeja *Apis mellifera* de origen de Sierra presentó mayor efecto antibacteriano *in vitro* que el de origen de Costa y Selva contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- La miel de abeja *Apis mellifera* de origen de Sierra presentó efecto antibacteriano a concentración del 100 y 50 % respectivamente.
- Las mieles de abeja *Apis mellifera* de origen de Costa y Sierra no presentaron efecto antibacteriano en las concentraciones evaluadas.

### Referencias:

1. Hujoel PP, Lingström P. Nutrition, dental caries and periodontal disease: a narrative review. *J Clin Periodontol.* 2017; 44 (Suppl. 18): S79–S84
2. James RJ, Breena D, Dakshaini P, Ganesh R. Prevalence of Dental Caries, Oral Hygiene Knowledge, Status, and Practices among Visually Impaired Individuals in Chennai, Tamil Nadu. *International Journal of Dentistry.* 2017; 1 - 6
3. Suratril MAL, Tjahja I, Setiawaty V. Correlation between dental health maintenance behavior with Dental Caries Status (DMF-T). *Bali Med J.* 2018; 7(1): 56-60
4. Diouf M, Kebe M, Guirassy ML, Diop M, Diouf A, Kanoute A, .et al. Dental Caries and Associated Determinants among Students of the Military School of Saint Louis (Senegal). *Open Journal of Epidemiology,* 2017; 7: 299-306
5. Ribeiro A, Azcarate-Peril MA, Cadenas MB, Butz N, Paster BJ, Chen T, Bair E, Arnold RR. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PLoS ONE* 2017; 12(7): e0180621
6. Garcia SS, Blackledge MS, Michalek S, Su L, Ptacek T, Eipers P, Morrow C, Lefkowitz EJ, Melander C, Wu H. Targeting of *Streptococcus mutans* Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome. *Journal of Dental Research.* 2017; 1 – 8
7. Kalidasan G, Saranraj P, Ragul V, Sivasakthi S. Antibacterial Activity of Natural and Commercial Honey-A Comparative Study. *Advances in Biological Research.* 2017; 11(6): 365-372
8. Kotris I, Talapko J, Drenjančević D. Evaluation of Antibacterial Activity of Two Different Honeys against Clinical Isolates of  $\beta$ -hemolytic Streptococci Group A. *SEEMED J.* 2017; 1(1): 67-73
9. OMS| Salud bucodental [Internet]. 2012 [Citado 05 de febrero del 2018]  
Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
10. MINSA| Salud Bucal [internet]. 2011 [citado 05 de febrero del 2018]

Disponibile

en:

[https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion\\_2.asp?sub5=13](https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13)

11. Smith L, Blinkhorn FA, Blinkhorn AS, Hawk F. Prevention of dental caries in Indigenous children from World Health Organization–listed highincome countries: A systematic review. *Health Education Journal*. 2018; 1–17
12. Gheorghiu IM, Mitran L, Mitran M., Iliescu AA, Scarlatescu S, Suciú I, Perlea P. Specific clinical aspects of the dental caries in deciduous teeth. *ARS Medica Tomitana*. 2017; 4(23): 195 -198
13. Kressirer CA, Smith DJ, King WF, Dobeck JM, Starr JR, Tanner ACR. *Scardovia wiggisiae* and its potential role as a caries pathogen. *J Oral Biosci*. 2017; 59(3): 135 - 141
14. Rani GN, Budumuru R, Bandaru NR. Antimicrobial Activity of Honey with Special Reference to Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017; 11(8): 05-08
15. Murugesan K, Vijayan H, Ezhilarasi RM, Maheshwaran P, Radha RS, Shama M. Antibacterial Activity of Honey against Selected Pyogenic Bacteria *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 2017; 45(2): 142-145
16. Wasihun AG, Kasa BG. Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia Wasihun and Kasa. *SpringerPlus*. 2016; 5:842
17. Mshelia BM, Adeshina GO, Onaolapo JA. The Antibacterial Activity of Honey and Lemon Juice against *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* Isolates from Respiratory Tract Infections. *Adv Biotech & Micro*. 2017; 4(5): 555660.
18. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* and dental caries *Rev. CES Odont* 2013; 26(1) 44-56
19. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*. 1980 Jun;44(2):331–84.
20. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*. 1986 Dec; 50(4): 353-80.
21. Inaba H, Amano A. Roles of Oral Bacteria in Cardiovascular Diseases — From Molecular Mechanisms to Clinical Cases: Implication of Periodontal Diseases in

- Development of Systemic Diseases. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2010;113(2):103–9.
22. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Sep;44(9):3313–7.
  23. Martínez MC RA. Estudio de las cepas de *Streptococcus* del grupo mutans presentes en binomios madre–hijo. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia* -. 2009;21(2):177–85.
  24. P.W. Caufield, G.R. Cutter and A.P. Dasanayake. Initial Acquisition of Mutans Streptococci by Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. *J DENT RES* 1993 72: 37
  25. Gronroos L, Alaluusua S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR-Fingerprinting. *Caries Res*. 2000 Nov-Dec; 34(6): 474-80.
  26. INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, Perú). Miel: Definiciones, requisitos y rotulado. NTP 209.168.1999. Lima, Perú. 8 p.
  27. Ball DW. The Chemical Composition of Honey. *Journal of Chemical Education*. 2007; 84(10): 1643 – 1646
  28. Correa, A. 2015. Evaluación de indicadores de deterioro de miel de diferentes especies de abejas. Tesis Mg. Sc. Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 140p.
  29. Hernández R, Fernández C, Baptisita P. Metodología de la Investigación. 6ta Edició. Mexico: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2014. 689 p.
  30. Valgas C, Machado S, Smânia EFA, Smânia AJr. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38: 369-380.
  31. L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2001; 62(2): 156 – 161
  32. Clinical and Laboratory Standards Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición. 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8
  33. OMS| Sugar and dental caries. 2017 [Citado 27 de mayo del 2018]

Disponible en: [http://www.who.int/oral\\_health/publications/sugars-dental-caries-keyfacts/en/](http://www.who.int/oral_health/publications/sugars-dental-caries-keyfacts/en/)

## Anexos

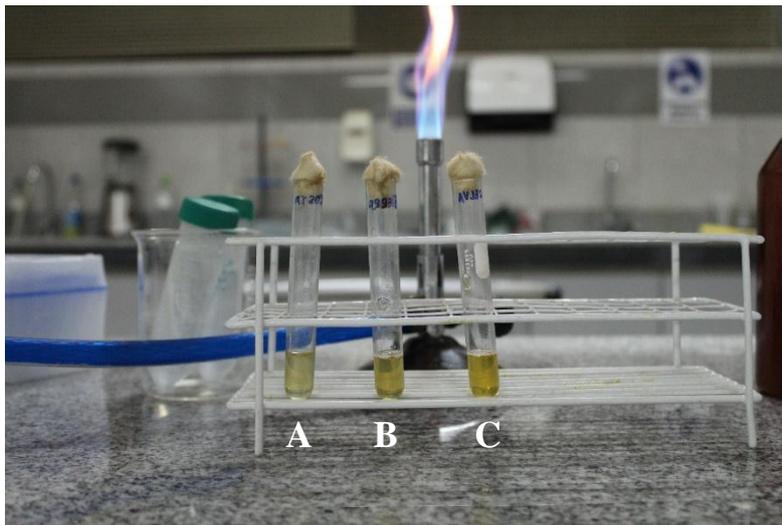
### Anexo 1

Miel de abeja *Apis mellifera*

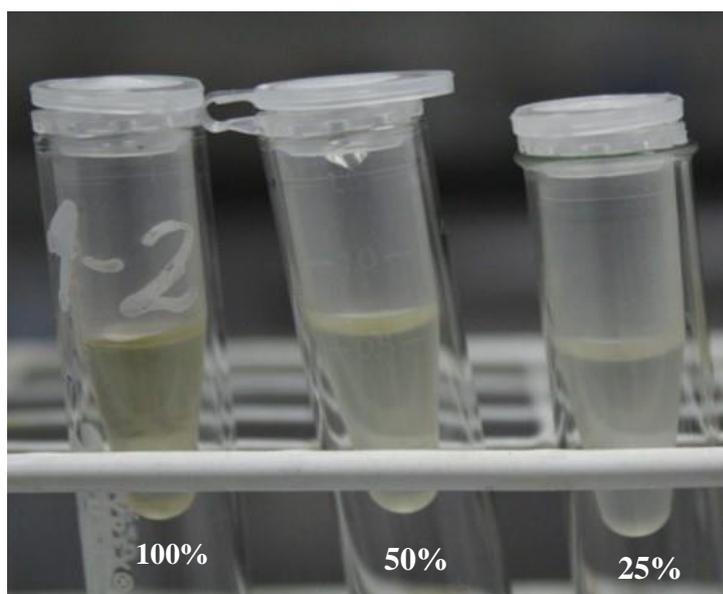


**Fig. 1.** Miel de abeja *Apis mellifera* (A): Origen Selva. (B): Origen Costa. (C): Origen Sierra.

## Anexo 2



**Fig. 2.** Miel de abeja *Apis mellifera* (A): Origen Costa. (B): Origen Sierra. (C): Origen Selva.



**Fig. 3.** Preparación de las concentraciones mediante dilución doble seriada.

### Anexo 3

#### Ensayo piloto de la actividad Antibacteriana

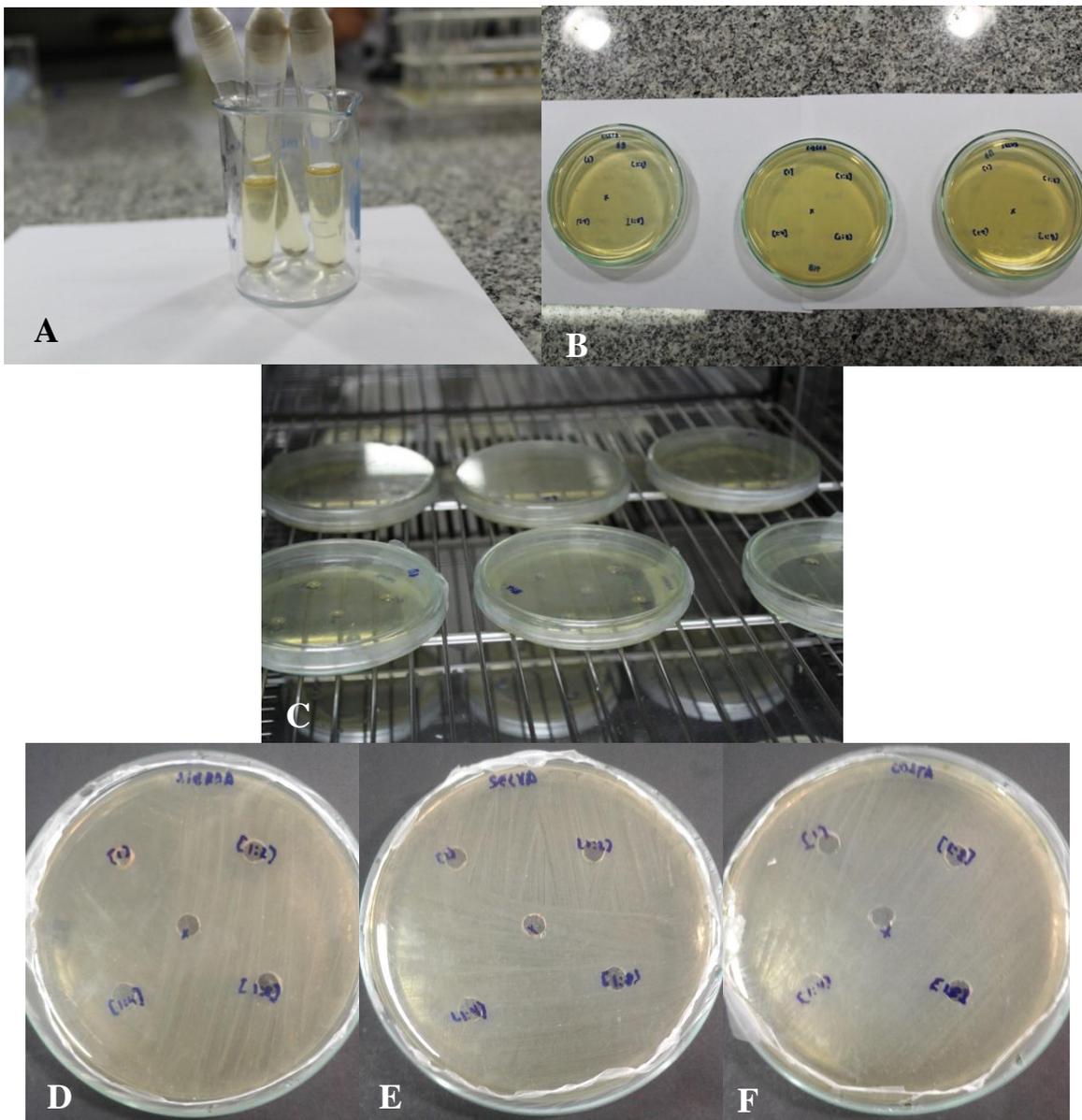


Fig. N° 4. Resultados de la actividad antibacteriana de la miel de abeja.

Anexo N°

Concentraciones	<i>Apis mellifera</i>				
	Costa				
	Halo de inhibición (mm)				
100%	0	0	0	0	0
50 %	0	0	0	0	0
25 %	0	0	0	0	0

04

**Tabla 2.** Evaluación del efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* de origen de Costa, contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Fuente: Datos proporcionados por el investigador

De acuerdo a la evaluación de la miel de abeja *Apis mellifera* de origen de Costa, no se evidenció

Concentraciones	<i>Apis mellifera</i>				
	Selva				
	Halo de inhibición (mm)				
100%	0	0	0	0	0
50 %	0	0	0	0	0
25 %	0	0	0	0	0

efecto antibacteriano *in vitro* contra *S. mutans* a las concentraciones de 100 %, 50 % y 25 % (Tabla 2).

**Tabla 4.** Evaluación del efecto antibacteriano de la miel de abeja *Apis mellifera* de origen de Selva, contra *Streptococcus mutans* ATCC 25175

*Fuente: Datos proporcionados por el investigador*

Para la miel de abeja de origen de Selva, no presentó efecto antibacteriano *in vitro* contra *S. mutans* ATCC 25175, a las concentraciones de 100%, 50% y 25 % (Tabla 4).

## Anexo N° 05

### Análisis de varianza de un factor Efecto antibacteriano de la miel de abeja de origen de Sierra

Análisis de Varianza	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1938,908	2	969,454	11568,203	,000
Dentro de grupos	1,006	12	,084		
Total	1939,914	14			

De acuerdo a la interpretación del análisis de varianza para la miel de abeja de origen de Sierra, se obtuvo un valor de  $P < 0,05$ , por lo tanto, se concluye que la miel de abeja tiene efecto antibacteriano.

### Prueba de Duncan

Concentraciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Concentración-3	5	,0000		
Concentración-2	5	14,3760		
Concentracion-1	5	27,8440		

De acuerdo a la prueba de Duncan, las concentraciones empleadas de la miel de abeja de origen de Sierra son diferentes significativamente.

## Anexo N° 06

### Análisis d cohen

Datos					Media	Desviación estándar	t	p	d de Cohen
28.1	27.4	27.78	28.12	27.82	27.8440	7.12500	60.060	.000	1.189
14.46	14.82	14.6	14.25	13.75	14.3760				

De acuerdo a la interpretación del análisis d cohen para la miel de abeja de origen de Sierra, se obtuvo un valor de d 1.189, por lo tanto, se concluye que la miel de abeja tiene efecto antibacteriano.

Anexo N° 7

**FICHA DE RECOLECCION DE DATOS**  
**Medida de halo de inhibición en la placa**

<i>Streptococcus mutans</i>	Miel de abeja Costa ( ) Sierra ( ) Selva ( )			Control positivo Etanol	Control negativo H <sub>2</sub> O destilada
	100 %	50 %	25 %		
<b>Placa 1</b>					
<b>Placa 2</b>					
<b>Placa 3</b>					
<b>Placa 4</b>					
<b>Placa 5</b>					