



**Universidad
Norbert Wiener**

**Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela Académico Profesional de Odontología**

Actividad antibacteriana del colutorio a base de latex
de croton lechleri frente al Streptococcus Mutans
ATCC 25175, estudio invitro 2022

**Tesis para optar el título profesional de Cirujano
Dentista**

Presentado por:

Robert Benjamin, Astudillo Aquino

Asesor: Mg. Esp. Marroquín García Lorenzo

Código ORCID: 0000-0001-9061-3270

**Lima– Perú
2022**

TESIS

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLUTORIO A BASE DE LATEX DE
CROTON LECHLERI FRENTE AL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC
25175, ESTUDIO INVITRO 2022”

LINEA DE INVESTIGACION

Salud, Enfermedad y Ambiente

ASESOR

MG. ESP. MARROQUÍN GARCÍA LORENZO

CÓDIGO ORCID

0000-0001-9061-3270

Dedicatoria

A Dios por acompañarme siempre y ser mi guía mis pasos.

A mis padres por su esfuerzo al educarme y darme su amor.

A mis hermanos por su apoyo.

Agradecimientos

Al MG. ESP. MARROQUÍN GARCÍA LORENZO por su asesoría en la presente tesis

Al laboratorio SCIENTIFIC QUALITY por su supervisión de los procedimientos realizados en el laboratorio de microbiología

JURADO:

- Presidente:

Dr. Torres Pariona, David Arturo

- Secretario:

Dr. Bouroncle Sacín, Jorge Enrique

- Vocal:

Dra. Velasquez Velasquez, Roxana Pilar

ÍNDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
RESUMEN	8-9
INTRODUCCION	10
1 CAPITULO I: PROBLEMA	
1.1. Planteamiento del problema	12-13
1.2. Formulación del problema	14
1.3. Objetivo	15
1.3.1. General	15
1.3.2. Específicos	15
1.4. Justificación	16
1.5. Limitaciones	16
2. CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes	17-24
2.2. Base teórica	25-30
2.3. Hipótesis	31-32
3. CAPITULO III: DISEÑO Y MÉTODO	
3.1. Metodología de la investigación	33
3.2. Enfoque de la investigación	33
3.3. Tipo de investigación	33
3.4. Diseño de la investigación	33

3.5. Población y muestra	33-34
3.6. Variables y operacionalización	35
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	36
3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos	36-41
3.9. Aspectos éticos	41
4. CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados	41-49
4.2. Discusión	50
5. CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	51-52
5.2. Recomendaciones	52
BIBLIOGRAFIA	53-56
ANEXOS	I- XXXVI
INDICE DE TABLAS	
Tabla 1 Resultados de los halos de inhibición de las concentraciones de sangre de Drago (100%, 75% y 50%), digluconato de clorhexidina 0.12% y agua destilada frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas en agar BHI.	41
Tabla 2 Comparación de las mediciones de los halos de inhibición frente <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de grado 100%.	42
Tabla 3 Comparación de las mediciones de los halos de inhibición frente <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de grado 75%.	43
Tabla 4 Comparación de las mediciones de los halos de inhibición frente <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de grado 50%.	44
Tabla 5 Concentración mínima inhibitoria.	45
Tabla 6 Concentración mínima bactericida.	46

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1 Medias de halos de inhibición frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas en agar BHI.	42
Gráfico 2 Medias de halos de inhibición con una concentración al 100 % en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas.	43
Gráfico 3 Medias de halos de inhibición con una concentración al 75 % en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas.	44
Gráfico 4. Medias de halos de inhibición con una concentración al 50 % en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas.	45

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la capacidad inhibidora del colutorio a base de látex de CROTON LECHLERI (sangre de grado) sobre la proliferación de Streptococcus mutans ATCC 25175 “in vitro”. Para el estudio microbiológico se usó látex de sangre de grado en diferentes concentraciones (100%,75% y 50%) se realizó el método de difusión en agar; para esto, se elaboraron 20 placas Petri con agar BHI; las cuales se dividieron en 4 por cada grupo de estudio. Las muestras se incubaron a 37°C, se registraron los halos de inhibición después de las 24 y 72 horas. Se uso como control positivo clorhexidina al 0.12 % para Streptococcus mutans ATCC 25175 y agua destilada como control negativo. Los datos se analizaron en el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) además se aplicó la prueba estadística T – Student. Teniendo como resultados que la concentración de sangre de grado al 100% dio unos halos de 7.20 mm a las 24 horas y de 7.31mm a las 24 horas ;al 75% dio unos halos de 6.41 mm a las 24 horas y de 6.51mm a las 48 horas ; al 50% dio unos halos de 6.26 mm a las 24 horas y de 6.36 a las 48 horas; clorhexidina 0.12 % (control positivo) a las 24 horas dio unos halos de 25.21mm y 25.40 a las 48 horas , mientras que el grupo expuesto a agua destilada (control negativo) no brindo halos de inhibición ni a las 24 ni 48 horas. Se llevo a la conclusión que el colutorio a base de látex de CROTON LECHLERI (sangre de grado) muestra una actividad inhibitoria “in vitro” en cultivos de Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 y 48 horas y que la clorhexidina al 0.12% presente una superior actividad antibacteriana.

Palabras Claves: Crotón lechleri, Streptococcus mutans, capacidad inhibitoria.

ABSTRACT

The objective of the study was to reveal the inhibitory capacity of CROTON LECHLERI (sangre de Grado) latex-based mouthwash on the proliferation of Streptococcus mutans ATCC 25175 "in vitro". For the microbiological study, grade blood latex was used in different concentrations (100%, 75% and 50%); the agar diffusion method was performed; for this, 20 Petri dishes were made with BHI agar; which were divided into 4 for each study group. The samples were incubated at 37°C, the inhibition halos were recorded after 24 and 72 hours. Chlorhexidine 0.12% was used as a positive control for Streptococcus mutans ATCC 25175 and distilled water as a negative control. The data was analyzed in the SPSS program, in addition, the T-Student statistical test was applied. Having as results that the concentration of grade blood at 100% gave halos of 7.20 mm at 24 hours and 7.31 mm at 24 hours; at 75% it gave halos of 6.41 mm at 24 hours and 6.51 mm at 48 hours; at 50% it gave halos of 6.26 mm at 24 hours and 6.36 at 48 hours; 0.12% chlorhexidine (positive control) at 24 hours gave halos of 25.21mm and 25.40 at 48 hours, while the group exposed to distilled water (negative control) did not give inhibition halos at 24 or 48 hours. It was concluded that the latex-based mouthwash of CROTON LECHLERI (sangre de Grado) shows an inhibitory activity "in vitro" in cultures of Streptococcus mutans ATCC 25175 at 24 and 48 hours and that 0.12% chlorhexidine has an inhibitory activity. superior antibacterial activity.

Keywords: Croton lechleri, Streptococcus mutans, inhibitory capacity.

Introducción:

Existen diferentes tipos de enfermedades que afectan a la cavidad oral, teniendo entre las más comunes la periodontitis y la caries dental, las cuales son producido por diferentes microorganismos, teniendo como uno de los causantes al *Streptococcus mutans* el cual aprovecha las condiciones del huésped para amplificar su daño. (1)

La formación de bolsas periodontales agrava la patología, debido a que esto significa un incremento de placa dura facilitando la aparición de caries dental haciendo que el uso del cepillado no será suficiente para el tratamiento de esta enfermedad, haciendo necesario realizar un tratamiento mecánico con a la par de un tratamiento farmacológico, sin embargo, la fitoterapia también se está volviendo en una alternativa de tratamiento, tanto en el ámbito preventivo como curativo. (1,2)

Las plantas medicinales se han empleado durante años para tratar diferentes dolencias, convirtiéndose en una alternativa debido a su efectividad, bajo costo y si se usa adecuadamente baja toxicidad. (2)

Crotón lechleri (sangre de grado) es un árbol que crece en los trópicos de las amazonas de América de sur, el cual contiene un látex de color rojo que es usado para diferentes afecciones, como antibiótico, antiviral, cicatrizante entre otros usos. (2)

El objetivo del estudio fue dar a conocer la capacidad inhibidora del colutorio a base de látex de *CROTON LECHLERI* (sangre de grado) sobre la proliferación de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, debido a que no existen muchos estudios científicos que demuestren su efectividad, además de impulsar su uso como una alternativa de tratamiento.

CAPÍTULO 1.

1. EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Dentro del ejercicio de la carrera nos topamos con todo tipo de enfermedades que afectan a nuestros pacientes, siendo una de las más comunes y resaltantes la caries dental y la enfermedad periodontal, teniendo por tal motivo como principal tratamiento el control de las diversas cepas bacterianas que las provoca teniendo como una de las principales causantes al *Streptococcus mutans*. Si bien podemos realizar un tratamiento farmacológico muchas veces estas bacterias adquieren una resistencia antibacterial (1), razón por la cual nos obliga a buscar alternativas de tratamiento como el usar productos naturales en este caso sangre de grados (*Crotón lechleri*).

En el presente muchos profesionales recomiendan diversos medicamentos para tratar estas patologías, sin tener en consideración los efectos adversos o la resistencia que podrían llegar ocasionar estos medicamentos, por lo que el uso de sustancias naturales que tengan capacidad antimicrobiana son una opción para tratar enfermedades producidas por *Streptococcus mutans* (2). Perú presenta una gran biodiversidad de plantas que son importantes en la medicina rural y entre ellas se ha podido verificar su efectividad contra diversos organismos, controlando su inicio, proliferación y hasta la erradicación de estos, una de estas plantas que se ha puesto a prueba en la presente investigación es la sangre de grado. (3)(4)(5).

Crotón lechleri es cultivada en la amazonia del Perú. Existe un aproximado de 52 especies de esta especie. El látex de este árbol es llamado "Sangre de grado o drago", contiene el alcaloide Proanticianidina oligomérica (SP-303) de acción antiviral y

Taspina (acción cicatrizante). Algunas especies de esta familia presentan en su composición antraquinonas, triterpenoides, epoxiácidos grasos, ácidos grasos insaturados y agentes antitumorales. (6)

El látex del árbol de sangre de grado se usa en la medicina rural desde tiempos remotos y en la actualidad se ha analizado y se ha llegado a la conclusión que tiene propiedades cicatrizante y antiviral. Investigaciones in vitro demuestran que posee capacidad inhibidora frente a diversos virus, incluyendo el virus de la hepatitis A y hepatitis B, el virus de la influenza A, el virus de la para influenza y virus herpes. (7)(8)

Lazo chambilla, realizo un estudio en el 2007 sobre el extracto de *crotón lechleri* para la inhibición de las bacterias generadoras de enfermedades periodontales, dando como resultado que los pacientes tratados con *crotón lechleri* tuvieron una reducción en la inflamación 24 horas después de haber iniciado el tratamiento, obteniendo una recuperación del 57,3 % de la muestra a los 30 días. (9)

Otro factor a tener en cuenta es que 5 de 11 especies de crotón muestran capacidad antimicrobiana generalmente para las sepas gram positivos. (10)

Teniendo esta realidad, el presente estudio trata de verificar la capacidad inhibidora de bacterias de la sangre de grado (*Crotón lechleri*) frente al *stretococcus mutans* y así poder tener un método seguro de poder eliminar este agente causal de tantas enfermedades orales.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?
- ¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?
- ¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?
- ¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en la actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 *Objetivo principal*

- Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

1.3.2 **Objetivo secundario**

- Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.
- Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.
- Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022
- Determinar la concentración mínima inhibitoria del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en la actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022

1.4 Justificación de la investigación

1.4.1 Justificación teórica

El trabajo actual tendrá un aporte al conocimiento con base científica, sobre el uso de la sangre de grado frente a afecciones producidas por *stretococcus mutans* y esto permitirá futuras investigaciones en el área de la medicina natural

1.4.2 Justificación metodológica

La siguiente investigación es de diseño experimental, de tipo longitudinal invitro, por ello se realizó porque aportara a la comunidad odontológica alternativas de tratamiento frente a las diversas enfermedades de cavidad oral, Ya en los últimos años el mal uso de diferentes fármacos para poder controlar las infecciones de diversos microorganismos ha generado diversas resistencias antimicrobianas , razón por la cual se hace necesario buscar otras formas de combatir estas afecciones , por lo tanto este trabajo se hace necesario nos brindara la información sobre el comportamiento del *stretococcus mutans* frente a la sangre de grado y de esa forma ver su efectividad , para posteriormente ser utilizado como medio para combatir a este agente microbiano y así poder ayudar a la sociedad con los diversas enfermedades que produce este agente microbiano a nivel oral .

1.4.3 Justificación practica

El presente trabajo nos brindara una herramienta más para poder combatir al *stretococcus mutans* y de esta forma evitar el uso indiscriminado de antibióticos que a la larga solo está produciendo una resistencia antimicrobiana.

1.5 Limitaciones

El presente trabajo no presento limitaciones.

CAPITULO II.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

GALA (2020) Realizaron el siguiente estudio con el objetivo de demostrar el potencial antimicrobiano in vitro del látex de *crotón gossypifolius* (sangre de grado) frente a microorganismos asociados a diversas infecciones en seres humanos. Las bacterias que se usaron fueron, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y el hongo *Aspergillus niger*. se utilizó la técnica de disco de difusión en agar. Se cultivaron las bacterias y el hongo en agar nutritivo y saburoud respectivamente en un tiempo y temperatura adecuado para cada especie. se observó halos de inhibición solo en las sepas de *S.aureus* , para poder cuantificar este efecto se procedió exponer a esta sepa a diferentes concentraciones del látex de sangre de grado (0.6 , 1.25 ,1.9,2.5 y 3.3)con un tiempo de 6 horas , se procedió a medir como unidades formadoras de colonia por unidad de volumen (ufc/mL) los datos fueron analizados mediante el programa SPPS dando como resultado que para 0,6% el crecimiento promedio fue de 900 ufc/mL, y en concentraciones de 3,3 % fue de 10 ufc/mL. En conclusión, el látex no mostro efecto inhibitor en las bacterias *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, ni en el hongo *A. niger*, pero si mostro inhibición en las cepas de *S. aureus*. (11)

CRUZ (2020) Realizo el siguiente estudio con el objetivo de determinar el efecto inhibitor in vitro del látex de *Crotón lechleri* en concentraciones de 100%, 50% y 25% solo y en sinergia con amoxicilina y claritromicina, sobre *Helicobacter pylori*?. Para esto se realizó cultivo de cepas de *Helicobacter pylori* y se utilizó la técnica de difusión de discos en agar *Mueller Hinton* embebidos en látex de sangre de drago en

concentraciones de 100%, 50 % y 25% solo y en conjugación con claritromicina y amoxicilina. Los resultados fueron apuntados en fichas y posteriormente se utilizó el programa SPPS, teniendo como resultado que las muestras sangre de grado al 100% formaron halos de inhibición cuyos tamaños no se podían medir en la placa Petri, por lo cual se expresó como >90mm. La inhibición con el látex de *Crotón lechleri* al 50% formó halos de 20.3 mm y en concentración de 25 % no presentó ningún halo de inhibición, por otro lado, se observó que existe aumento en el efecto inhibidor en la sinergia entre sangre de grado más amoxicilina más claritromicina con 34,9 mm. En conclusión, la sangre de grado en concentraciones de 100%, 50 % y en sinergismo con amoxicilina y claritromicina presenta propiedades antibacterianas frente al *Helicobacter pylori*. (12)

CHINININ (2018) Realizo el siguiente estudio con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano in vitro del látex de *Crotón lechleri* (sangre de grado) frente a *Staphylococcus aureus*. La población estuvo constituida 06 placas conteniendo el cultivo bacteriano de *Staphylococcus aureus* , Como medio de crecimiento bacteriano se preparó Agar Müller Hinton Los discos que se utilizaron, previamente fueron embebidos con los 15 µL de los siguientes tratamientos: etanol 96°, eritromicina 15 µg, *Crotón lechleri* al 50%, 70% y 100%, utilizándose como disolvente etanol . , se hicieron las mediciones de los halos de inhibición y posteriormente fueron analizados mediante el programa SPPS dando como resultado el promedio de los diámetros de los halos de inhibición bacteriana de 13; 14.83 y de 15.33 mm para sangre de grado a 50%, 70% y 100% de concentración Así también, los resultados indican que la mayor actividad antibacteriana se observa en el tratamiento con eritromicina 15 µg, siendo el promedio de sus diámetros de inhibición de 28 mm Existe diferencia altamente significativa entre los porcentajes de inhibición promedio de los diferentes

tratamientos, siendo el tratamiento optimo el látex *Crotón lechleri* sangre de grado puro con un 54.75 de porcentaje de inhibición de cultivos de *Staphylococcus aureu*.(13)

SEGURA (2018) realizo este estudio con el objetivo de determinar el efecto inhibidor de la sangre de grado y de la uña de gato in vitro sobre cepas de *Porphyromona Gingivalis*. Para esto se usó diluciones de Sangre de grado y Uña de Gato en concentraciones de 100 % 75 % y 50% a la par se hizo dos controles, un control positivo de clorhexidina 0,12% y como control negativo suero fisiológico. Se uso la técnica de disco de difusión en agar , la población de estudios fueron 15 cajitas petri las cuales fueron cultivadas con cepas de *Porphyromona gingivalis* para luego aplicarles sangre de grado y extracto de uña de gato en diluciones de 50%, 75% y 100 % y clorhexidina como control positivo y suero fisiológico como control negativo, los halos de inhibición fueron medidos y posteriormente analizados mediante el programa SPPS dando como resultado que la dilución de Sangre de grado en concentraciones de 50% llega a formar un halo de 9mm, en concentraciones de 75% Y 100% presento un halo de 7 mm. El extracto de Uña de Gato en una concentración de 75% y 100% presento un halo de 8mm y en una concentración de 50% presentan efecto inhibitorio similar al suero fisiológico. Dando conclusión que la sangre de grado tiene un efecto inhibidor y en una concentración de 50 %, 75% y 100% mientras que la uña de gato solo en concentraciones de 75% y 100%. (14)

AVILÉS (2018) Realizaron un estudio experimental con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana in vitro de *Crotón lechleri* (sangre de grado) sobre *Streptococcus mutans*” para esto se utilizaron concentraciones al 50 %, 75% y 100%,

como control negativo agua destilada y como control positivo clorhexidina al 0.12%, se prosiguió a embeber los discos con látex de *c. lechleri* en concentraciones de 50%,75% y 100% con ayuda de una pipeta con una cantidad 20 µL en cada disco sobre colonias de *s. mutans* en agar Müller , a las 48 horas se procedió a medir los halos y analizarlos mediante el programa SPSS , teniendo como resultados que las concentraciones al 75% y al 100% de *C. lechleri* demostraron tener actividad antimicrobiana in vitro , mientras que la concentración al 50% no demostró ninguna actividad frente a sepas de *S. mutans*. En conclusión, el látex de *C. lechleri* puede ser usado como una alternativa de tratamiento frente al *S. mutans* en concentraciones de 100% y 75 %. (15)

CAYO (2014) Realizo un estudio con el objetivo de hacer un análisis in vitro del efecto antimicrobiano del *croton lechleri* (*sangre de grado*) sobre sepas de *Streptococcus mutans* ,el grupo de estudio estuvo compuesta por 30 cultivos de *streptococcus mutans* contenidas en Agar *Müller hinton* , se usó diversas concentraciones de *croton lechleri* al 100% , 75 % y 40 % y se midieron los halos alrededor de los discos sumergidos con cada una de las diferente diluciones sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Para examinar los resultados se usó el programa SPSS el cual dio como resultados que las concentraciones de 100 % dio como resultados unos 1.8 mm en sus halos de inhibición y las de 75 % dio como resultado un valor de 1.1 mm en su halo de inhibición sobre cultivos de sepas de *Streptococcus mutans* mientras que el de 40 % no tuvo ningún efecto inhibidor sobre las sepas de *Streptococcus mutans*. Llegando a la conclusión que si existe un efecto inhibidor de la sangre de grado frente a sepas de *Streptococcus mutans* en concentraciones de 100% y 75 %. (16)

CORRALES (2013) Realizaron un estudio experimental con el objetivo de determinar la capacidad antibacteriana in vitro del *C. lechleri* frente a bacterias aeróbicas extraídas de úlceras cutáneas de los pacientes del centro de salud AGUA DE DIOS (Colombia) para lo cual se aisló e identificó las cepas bacterianas presentes en dichas lesiones cutáneas mediante el proceso automatizado de BBL-Cystal™, se procedió a hacer las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana in vitro mediante las pruebas de difusión en disco y difusión en pozo. Se llegaron a aislar 7 especies bacterianas de las muestras extraídas de las lesiones cutáneas, aparte se incluyó como control cepas de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli*. Durante la ejecución de ambas pruebas se llegó a determinar qué tanto por la técnica de difusión de disco y difusión en pozo el extracto etanólico de sangre de grado demostró tener un efecto inhibitorio, sobre todo en el segundo método. Llegando a la conclusión que el *C. lechleri* presenta un efecto inhibitorio frente a las bacterias ubicadas en las úlceras cutáneas sobre infectadas de los pacientes presente estudio, ratificando su efecto antibacteriano como en anteriores estudios. (17)

LAZO (2007) Realizó el siguiente ensayo clínico con el objetivo de determinar efecto antimicrobiano del extracto de sangre de grado y del geranio en pacientes con gingivitis gestacional, para lo cual se usó una muestra de 150 gestantes del centro de salud "SAN BARTOLOME" con diagnóstico de gingivitis asociado a la gestación. Se dividió en dos grupos de 75 cada uno, a uno se le hizo tratamiento mecánico más la aplicación tópica con extracto de sangre de grado, mientras que al otro se le hizo tratamiento mecánico con topicación con extracto de geranio, se les aplicó el índice gingival de Loe y Silness. Se les realizó controles al 1er día, 3er día, 7mo día, y 30mo día para evaluar si había alguna mejora con respecto a la gingivitis. Se usó como instrumento el índice gingival de Loe y Silness, dando como resultado que a las 24 horas

ambos grupos presentare una notable mejoría , teniendo una disminución en el sangrado y en el edema ,para el 30vo día el grupo al cual se le aplico topicación con extracto de geranio presento una recuperación del 57,3 % mientras que la de extracto de sangre grado el 22,7 % ya no presentaba gingivitis y el 76,3% presentaba solo gingivitis leve .teniendo como conclusión que ambos extractos son efectivos para el tratamiento de enfermedades periodontales teniendo en cuenta que los que se trataron con extracto de geranio presentaron mejores resultados. (9)

HUAPAYA (2003) Realizo el siguiente estudio con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano in vitro del látex de *crotón lechleri* frente a sepas de *escherichia coli*, *pseudomona aeruginosa* y *staphylococcus aureus* y hacer un control microbiológico sobre muestras de *crotón lechleri* obtenidas en el comercio ambulatorio, para lo cual se adquirió 50 muestras de diferentes lugares. Se realizo el recuento total de *mesófilos aerobios* (RMA), recuento de coliformes fecales (RCF) recuento de coliformes totales (RCT) y recuento de levaduras (RL) para ello se usó la técnica recuento de placa, para poder realizarlos las muestras fueron procesadas como si fueran de una muestra de agua, diluyéndolas con buffer fosfato a ph 7, siendo agregados en agar ATS homogenizando con movimientos rotatorios y luego puestos a incubar a 35 grados por 24 horas. Los resultados fueron analizados por el programa SPPS , teniendo como resultados que 24 muestras dieron recuentos mesófilos entre 10 y 100 UFC/ml y que 38 presentaron recuentos por encima de 100 UFC/ml, que 18% de las muestras dieron positivo a coliformes totales, el 9 % a coliformes fecales y solo una de las muestras presento recuentos de coliformes de 14 UFC/100 ml, 36 muestras dieron un recuento de levaduras menores a 20 UFC/ml y solo 4 de ellas presentaron recuentos que superaran el 66 UFC/ml. La capacidad inhibidora de bacterias se midió utilizando el método de excavación de placa de cultivo , las cuales estaban anticipadamente

preparadas con microorganismos de *escherichia coli*, *pseudomona aeruginosa* y *staphylococcus aureus* , se les aplico látex de sangre de grado en diferentes concentraciones (10 %, 25%, 50% y 100 %) también se hizo un control negativo con suero fisiológico y un control positivo con ciprofloxacina 5 mg/ml , las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas al final se evaluó los resultados mediante la medición en milímetros de los halo de inhibición , observándose que solo en concentraciones de 100 % y 50 % de látex de sangro de grado halos de inhibición comparados a los del control positivo en las sepas de S.aureus y en menor grado de P.aeruginosa , mientras que en cepas de E.coli no se observó halo de inhibición. Como conclusión se puede decir que la sangre de grado adquiridas en el comercio ambulatorio posee mayor recuento bacteriano que las adquiridas del mismo lugar de producción y que la sangre de grados en concentraciones de 100 % y 50 % poseen una buena actividad inhibidora bacteriana en gran positivos. (18)

TAMARIZ (2003) Realizaron un estudio con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana in vitro del látex de *Crotón Lecheri* frente sepas de *Helicobacter pylori*” para lo cual se trabajó con 41 cepas de *H.pylori* y con cuatro diferentes presentaciones de sangre de grado(Látex de sangre de grado brindado por laboratorios Química Suiza, látex obtenida en la Ciudad de Tarapoto y Sangre de grado comercial marca “Dragón”, adquirida en una casa naturista del centro de Lima) se embebieron disco con las diversas presentaciones adquiridas de sangre de grado sobre colonias de *H. pylori* , cuyos datos fueron analizados por el programa SPPS teniendo como resultado que las muestras que la sangre de grado obtenida en los laboratorios de Química Suiza dieron unos halos de 15,56 mm , por otro lado la sangre de grado obtenida de Tarapoto produjo halos de 14.98 mm , la sangre de grado obtenida en un centro naturista ambulatorio dio halos de 14,68 mm , al final la sangre de grado obtenida en una casa

naturista en breña dio como resultados unos halos de inhibición de 14.22 mm . llegando a la conclusión que el latex de sangre tiene efecto inhibitor frente a sepas de *helicobacter pylori*. (19)

2.2 Bases teóricas

2.2.1 CAVIDAD ORAL

La cavidad oral humana es un complejo ecosistema compuesto por una gran cantidad de especies de bacterias (20), razón por la cual diversos estudios reportan que las bacterias están relacionadas al inicio de las principales enfermedades orales como caries dental y las enfermedades periodontales, señalando que la acumulación de bacterias en las superficies dentales conocido como placa bacteriana son un factor indispensable para el desarrollo de estas afecciones orales. (21)

2.2.2 CARIES DENTAL:

La caries dental es considerada una enfermedad infectocontagiosa multifactorial, siendo una de las enfermedades más frecuentes de la cavidad oral debido al consumo de azúcares fermentados. (22)

La caries provoca una destrucción focalizada de los tejidos duro, inducida por los ácidos que son producidos por microorganismos presentes en los depósitos de alimentos que se encuentran adherido a los dientes. Estos ácidos son producto de una serie de procesos metabólicos que se producen en la biopelícula que cubre el área afectada, originando de esta manera el proceso carioso. (23)(24)

2.2.2.1 Epidemiología

La caries dental es una de las enfermedades con mayor incidencia a nivel mundial, llegando a considerar un problema de salud pública sobre todo en países latinoamericanos (25)

La OMS da a conocer que el 90% de la población peruana está afectado por una enfermedad bucodental. (26)

De acuerdo con el MINSA (Ministerio de Salud del Perú), un estudio realizado en el año 2012-2014, arrojó como resultado una incidencia de caries global de 85.6%. (27)(28)

2.2.2.2 Etiología

El factor etiológico de mayor relevancia para la formación de caries es el consumo de azúcares.

La triada de Keyes establecida en 1960 nos plantea como factores etiológicos de la caries dental tres agentes (Huésped, microorganismos y dieta) que interactúan entre sí a la cual se le agregó el factor tiempo, estos factores son fundamentales para el inicio de la caries dental.

Se consideran a varios microorganismos, (Streptococcus Mutans, Lactobacillus y Actinomyces) como causantes del avance del proceso carioso.(29)

2.2.3 SANGRE DE GRADO (*CROTON LECHLERI*)

2.2.3.1 Descripción botánica del *crotón lechleri*

Árbol de copa ancha, que logra llegar de 10 a 20 m de altura, con una raíz cilíndrica cónica, axomorfica, con un peridermis formado por corcho. (30) La corteza del tallo contiene abundantes lenticelas y el látex es de color rojizo de diferentes tonalidades. (31) Sus hojas poseen un par de glándulas en la base de 20 a 12 cm de largo por 12 a 5 cm de ancho, en las hojas más jóvenes son de color rosado, Fruto en forma de globo encapsulado de 3 mm de largo y 4,5 mm de ancho, sus semillas son lisas con carúncula y endosperma oleaginoso. (32)

2.2.3.2 Hábitat y distribución

Se ubica en los trópicos y subtrópicos de Sudamérica, crece silvestremente en las montañas y regiones selváticas; generalmente en bosques de mucha humedad. (32)

2.2.3.3 Ubicación en el Perú

Distribuido en las amazonas a una altura de 705 a 1 660 msnm; en los departamentos de San Martín, Amazonas, Cusco, Junín, Huánuco, Loreto y Madre de Dios, también se encuentra en los valles de Oxapampa, Palcazú, Cacazú y Entaz del departamento de Pasco. (32)

2.2.3.4 Composición química

Corteza: conformada por esteroides, alcaloides (taspina) cumarinas, flavonoides, taninos (54%), saponinas (menor concentración), antocianinas, proantocianidina-1, proantocianidina-4, proantocianidina SP303; antracenos; también se encuentra lactosa, galactosa y ramnosa, triterpenoides, además compuestos fenólicos (ácido gálico) en

un 4 %; posee vitamina A, E y C; ácidos orgánicos de carácter débil como el almidón, celulosa, grasas, lignanos, mucílagos, proteínas, catequinas.

Hojas: alcaloides aporfina (taliporfina y glaucina) (33)

2.2.3.5 Farmacobotánica y farmacognosia

La corteza exuda un látex de color rojo de diferente tonalidad el cual vendría a ser el fármaco; para la preservación del látex, se suele adicionar aguardiente a razón de 50 ml de látex. Dentro de sus componentes podemos encontrar la taspina y su sal clorhidrato, las cuales separadas del látex tienen una capacidad desinflamatoria. La resina posee cualidades antisépticas y antiinflamatorias (33)

2.2.3.6 Usos medicinales

El látex se usa para el tratamiento de enfermedades estomacales como la diarrea crónica, leucorrea; gastritis, úlceras, también se usa como estimulante de defensas del organismo, para combatir afecciones bacteriales, virales y fúngicas; para tratar enfermedades como la influenza, herpes, anemias, uta, tuberculosis, resfriados, acné, amigdalitis, gingivitis, cervicitis; para poder bajar de peso, controlar hemorragias, antioxidante, antireumático, antiinflamatorio y cicatrizante (34)

2.2.4 STREPTOCOCOS MUTANS

El Streptococcus mutans vendría a ser un coco Gram positivo, dispuesta en cadenas, catalasa negativa, productora de ácido láctico capas de variar de un medio de pH 7(neutro) a pH 4.2 en un periodo de 24 hrs. *Streptococcus mutans* se ha dividido en diferentes grupos en base a sus propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas. Teniendo como hábitat natural la cavidad oral. (35)

El *S. mutans* tiene como característica un corto efecto post-pH, el cual se describe como el tiempo requerido para recupera su crecimiento habitual. Según lo expresado, no es raro que estas especies bacterianas alcancen rápidamente el pH crítico 5.5 iniciando el proceso de desmineralización. (36)

2.2.4.1 Adquisición *Streptococcus mutans*.

Se puede ubicar al *S. mutans* después de la erupción dental primaria de forma constante, lo cual se debe a su necesidad de un tejido duro no descamativo para su desarrollo. Se considera como principal causante de adquisición del *S. mutans* en la infancia a la saliva de la madre. Diversos estudios han llegado a la conclusión que el tiempo exacto de colonización es a los 2 años y 2 meses de edad, periodo al cual se le ha denominado “ventana de infectividad”. Es de suma importancia tener claro que el *S. mutans* forma parte de la microflora oral, razón por la cual es habitual encontrarla tanto en pacientes lesiones cariosas, como en pacientes sin caries. (37)

2.2.4.2 Factores de virulencia

Vendrían a ser aquellas características que convierten a este microorganismo un patógeno:

- Acidogénesis: Rápida metabolización de los azúcares por la vía glucolítica, logrando así el pH crítico (4.5 – 5.5)
- Acidofilia: La acidificación del biofilm.
- Aciduricidad: cualidad de poder producir en un medio cuyo pH es bajo, ácido.

(38)

2.3 Formulación de la hipótesis

Hipótesis general:

H1; Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

H0: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

Hipótesis específicas:

- H1: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.
- H0: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.
- H1: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

- H0: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.
- H1: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón Lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.
- **H0:** No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón Lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.
- H1: En una concentración mínima del colutorio a base de látex de *Crotón Lechleri*, Si hay actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.
- H0: En una concentración mínima del colutorio a base de látex de *Crotón Lechleri*, No hay actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

CAPITULO III.

3. METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación

Inductivo; ya que se necesita realizar un análisis de un fenómeno observado para llegar a la conclusión.

3.2. Enfoque de la investigación

Cuantitativo; ya que se busca recopilar datos y analizarlos utilizando un método estadístico para sacar conclusiones.

3.3. Tipo de investigación

Aplicada; ya que busca resolver un determinado problema, centrándose en la búsqueda del conocimiento para su posterior aplicación.

3.4. Diseño de la investigación

El estudio es de diseño experimental; Porque se valorará el efecto de las variables, donde el investigador manipula las condiciones de la investigación.

longitudinal in vitro; Porque es un estudio en el cual se harán la recolección de datos en dos momentos.

3.5. Población y muestra

3.5.1. Población

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 adquiridas de un Laboratorio. Que fueron empleadas para determinar la capacidad antibacteriana del látex de sangre de grado en diferentes concentraciones 100%,75% y 50%, teniendo como control positivo clorhexidina 0.12% y como control negativo agua destilada, las cuales constituyeron

un total de 20 placas Petri divididas en 4 placas por grupo de estudio, conteniendo 4 discos cada placa.

3.5.2. Muestra

La técnica de muestreo fue no probabilística por conveniencia.

La muestra estuvo constituida por 20 placas Petri (cuatro placas por grupo)

Grupo de estudio: 12 placas

Crotón Lechleri 100% 4 placas Petri (4 discos por placa)

Crotón Lechleri 75% 4 placas Petri (4 discos por placa)

Crotón Lechleri 50% 4 placas Petri (4 discos por placa)

Grupo de control: 8 placas

Control positivo; clorhexidina 0.12% 4 placas Petri (4 discos por placa)

Control negativo; agua destilada 4 placas Petri (4 discos por placa)

3.6. Variables y operacionalización

Variable independiente: *Actividad antibacteriana* del colutorio a base de aceite esencial de *crotón lechleri*.

Variable dependiente: *Streptococcus mutans*.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES				
VARIABLES	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
VARIABLE INDEPENDIENTE <i>Actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de crotón lechleri</i>	La actividad del <i>Crotón lechleri</i> , tiene propiedades bactericidas, desinflamante, hemostática y como cicatrizante, untándolo directamente sobre la herida en la piel.	Concentraciones 100% 75% 50%	10 ul por cada disco de papel filtro	Razón
VARIABLE DEPENDIENTE Streptococcus mutans	Streptococcus mutans es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa ubicada generalmente en la boca , formando parte del biofilm dental.	Formación de halos de inhibición en el Tiempo.	Medición de los halos en milímetros con el vernier de halos.	Razón

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Técnica

La técnica empleada fue la Observación directa la que consistió en realizar 2 observaciones y medir los halos de inhibición a las a las 24 y 48 horas luego los resultados se registraron en la ficha de recolección de datos y, luego, se trasladaron al informe de ensayo.

3.7.2. Descripción de instrumentos

- Documental: Fichas elaboradas específicamente para registrar los milímetros de los halos, la cual estaba dividida por grupos de estudios y número de observaciones.
- Mecánico: Vernier digital y/o regla milimétrica; aparato metálico que sirve para hacer mediciones precisas

3.7.3. Confiabilidad

La confiabilidad mediante el programa alfa de Cronbach SPSS fue del 95 %, el instrumento paso por un juicio de expertos.

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

3.8.1 Plan de procesamiento

Procedimiento

Antibiograma: SQ-LE-001. Técnica de Kirby-Bauer. Método de disco de difusión en agar.

- a) Método de prueba El método aplicado para analizar la efectividad antibacteriana fue el ensayo de antibiograma por la técnica de Kirby-Bauer (Método de disco de difusión en agar) empleando discos antibiograma, los cuales estuvieron

impregnados con las siguientes sustancias: Sangre de Drago 100%, sangre de drago al 75 %, sangre de drago al 50%, digluconato de clorhexidina al 0.12% y agua destilada.

- b) Cepa bacteriana para el estudio: fue realizada con cepas estándar ATCC, (American Type Culture Collection) implicada en la caries dental *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- c) Preparación de medio de cultivo del Agar BHI, Se preparó LL agar BHI según las instrucciones del fabricante, pesándolo en una balanza, e hidratándolo con agua destilada y se autoclavó durante 15 minutos a 121 C. Luego, se procedió a temperar en baño termostático a 45 C. Posterior a eso se colocó, en esterilidad, 100ml de fluconazol al 0.12 %, inmediatamente, en esterilidad, se depositó agar BHI en las placas Petri a emplear en el ensayo. Se dejó solidificar por 15 minutos las placas con dicho medio de cultivo para posteriormente ser utilizada en el ensayo antibiograma y fueron rotulados según las sustancias a ensayar y el número de placa Petri. Se realizó la prueba de esterilidad de las placas de agar BHI incubándolas a 37 C por 24 horas.
- d) Reactivación de la cepa y reconocimiento de *Streptococcus mutans*. El medio que se utilizó para la reactivación de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue caldo BHI, el cual se incubó a 37°C por el tiempo de 24 horas en anaerobiosis. Todo el procedimiento fue realizado en condiciones estériles, pasando el tiempo mencionado, se procedió a sembrar el microorganismo por la técnica de estriado y agotamiento en placas Petri de Agar BHI, las

cuales se incubaron por 24 horas a 37°C en anaerobiosis para la identificación de las colonias jóvenes de *S. mutans*.

- e) Preparación del inóculo de *Streptococcus mutans*. Bajo condiciones estériles y cerca del mechero Bunsen, se tomó una porción de una colonia aislada y se inoculó en caldo BHI estéril de 5 mL, se incubó a 37°C por 24 horas. A este cultivo en BHI se le estandarizó a una turbidez de McFarland de 0,5, es decir, a $1,5 \times 10^7$ UFC/mL.
- f) Inoculación de las placas con *Streptococcus mutans*. Una vez graduada la suspensión del inóculo, se toma un hisopo estéril y se humecta con cultivo en caldo BHI de *Streptococcus mutans* a una turbidez de McFarland de 0,5 y se disemina con hisopo en las 20 placas Petri con agar BHI a ensayar, las cuales se realizaron en cuatro direcciones sobrepuestas para asegurar la presencia de *Streptococcus mutans* en toda la placa Petri. Luego, se procedió a rotular, las sustancias de prueba como Sangre de Drago 100%, sangre de drago al 75%, sangre de drago al 50%, digluconato de clorhexidina al 0.12% y agua destilada.
- g) Colocación de los discos antibiograma y la sustancia de prueba. Se procedió a la colocación de los discos antibiograma, depositando, con pinza estéril, los discos antibiograma en las 24 placas de agar BHI inoculadas con *Streptococcus mutans*. El número de discos antibiograma, por placa y por sustancia de prueba, se debe al tamaño de los halos de inhibición vistos en los ensayos previos. Luego se procedió a trabajar con los grupos de placas por sustancia de prueba ya determinados en los rótulos. Se depositó con micropipeta, en cada disco antibiograma, 15 µL de cada sustancia de prueba: Sangre de grado 100%, sangre de grado al 75%, sangre de grado al 50%, digluconato de clorhexidina al 0.12% y agua destilada, las cuales están en el rótulo de las placas. Luego, se dejaron reposar 30 minutos y se

colocaron en jarras herméticas en las cuales se produjo anaerobiosis por la generación de dióxido de carbono (CO₂) por la combustión de una vela. Estas jarras fueron colocadas en la incubadora a una temperatura de 37 C por un tiempo de 24 y 48 horas. El desarrollo de todo el procedimiento microbiológico del ensayo se realizó dentro de un área de 10 centímetros de radio alrededor de la llama del mechero de bunsen.

- h) Lectura de resultados: Medición de halos de inhibición de sustancias de prueba frente a *Streptococcus mutans*. Después de 24 y 48 horas de incubación, las placas fueron examinadas y se procedió a la lectura por cada periodo de tiempo, con ayuda de un contador de colonias (de fondo oscuro y con iluminación en la base de placa), de los diámetros de los halos de inhibición frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, los cuales fueron medidos con una Regla de Vernier, la cual nos brindó medidas individuales de los halos (en milímetros) formados alrededor de cada discos embebidos con cada sustancia de prueba en las placas con cultivo.
- i) Registro de resultados. Se registraron los resultados en la ficha de recolección de datos y, luego, se trasladaron al informe de ensayo.

Concentración mínima inhibitoria SQ-LE-0Z5. Determinación de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de macro dilución en caldo. (Técnica cualitativa)

- A. Se realiza diferentes concentraciones de sangre de drago a 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100% en tubos de ensayo con 2ml de caldo BHI. Se realizo controles positivos (caldo BHI + *Streptococcus mutans* ATCC 25175) y negativo (Caldo BHI + sangre de grado). Luego, se siembra, en cada tubo de las diferentes concentraciones y en el control positivo, 100uL de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a una concentración de 0.5 de escala de turbidez de McFarland, lo equivalente a 1,5 x

10' UFC/mL. Estas diluciones y controles con el microbio en estudio se colocan en jarras herméticas de anaerobiosis y se incuban a 37°C por 24 horas.

- B. Luego de la incubación, se traslada de cada tubo, por duplicado, 10uL de cultivo a tubos rotulados con caldo BHI de 2mL, también se siembra un tubo para control positivo y otro tubo como control negativo. Se incuban por 24horas a 37°C en anaerobiosis.
- C. Posterior a la incubación, en el control positivo, se debe observar turbidez y el control negativo debe estar translucido. Por otro lado, las diluciones con sangre de drago y *Streptococcus mutans* se observará lo siguiente: aquella dilución o la mayor dilución en la que no haya turbidez en el caldo BHI, esta dilución se considerará como la concentración mínima inhibitoria o bactericida.

3.8.2 Análisis de datos

Una vez que se ejecutó la recolección de datos debidamente con la ayuda de las herramientas fueron sujetas a los requisitos estadísticos. Se confeccionaron en el paquete estadístico IBM SPSS Statistic 24 en español con el software Windows 10. De esta manera, se utilizó la prueba de ANOVA, en cada uno de los grupos que presentaron una distribución normal para las muestras relacionadas, comparando las medias entre las concentraciones del látex de lechleri (sangre de grado) (50%,75% y 100%), el control negativo (Agua destilada) y el control positivo (Clorhexidina 0.12 %) y la prueba Kruskal Wallis, para los grupos que no presentaron distribución normal. Se ordenaron los datos y se presentaron en tablas y en gráficos estadísticos para su respectiva interpretación y análisis, teniendo en cuenta un nivel de significancia estadística ($p < 0.05$).

Se realizo el análisis de los datos a través del cálculo de medidas de tendencia central y de dispersión.

3.9 Aspectos éticos

Debido a que la investigación fue In vitro, no necesito de un consentimiento informado ya que no se experimentará en humanos debido a que usará cepas bacterianas.

CAPITULO IV.

4.PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Resultados

RESULTADO GENERAL

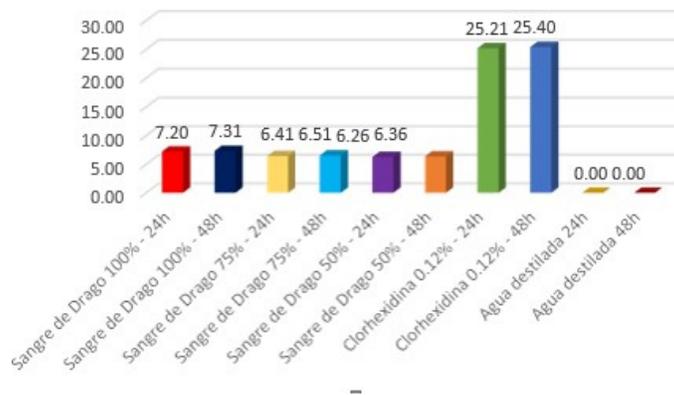
- Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

Tabla 1. Resultados de los halos de inhibición de las concentraciones de sangre de Drago (100%, 75% y 50%), digluconato de clorhexidina 0.12% y agua destilada frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas en agar BHI

Réplicas de Anfibiógrama	ANTIBIOGRAMA									
	Halo de inhibición frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (*) en milímetros (mm) en agar BHI									
	Y1: Sangre de Drago						CONTROL + Digluconato de Clorhexidina 0.12%		CONTROL - Agua destilada	
	100%		Dilución 75%		Dilución 50%		24h	48h	24h	48h
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	8.9	9.0	6.2	6.3	6.4	6.5	28.6	28.9	0	0
2	7.9	8.0	6.3	6.5	6.0	6.1	26.7	27.0	0	0
3	7.2	7.3	6.2	6.3	6.1	6.2	24.0	24.2	0	0
4	6.3	6.4	6.0	6.1	6.2	6.3	24.2	24.3	0	0
5	6.9	7.0	6.5	6.6	6.0	6.1	23.8	23.9	0	0
6	7.2	7.3	6.1	6.1	6.3	6.4	25.5	25.7	0	0
7	7.8	8.0	6.3	6.4	6.0	6.1	26.8	27.0	0	0
8	6.5	6.6	6.1	6.2	6.8	7.0	26.5	26.7	0	0
9	7.3	7.4	6.2	6.3	6.1	6.2	26.8	27.0	0	0
10	7.9	8.0	6.3	6.4	6.0	6.1	23.9	24.1	0	0
11	8.1	8.2	8.7	8.9	6.9	7.0	21.5	21.7	0	0
12	6.4	6.5	6.0	6.1	6.1	6.1	23.8	23.9	0	0
13	6.3	6.4	6.5	6.6	6.0	6.1	23.6	23.7	0	0
14	6.8	7.0	6.9	7.0	7.0	7.2	21.5	21.7	0	0
15	6.7	6.8	6.3	6.4	6.0	6.0	31.1	31.4	0	0
16	7.0	7.1	5.9	6.0	6.2	6.3	25.0	25.2	0	0

Según la tabla 1, se puede observar que existe diferencias entre las lecturas de los halos de inhibición de las concentraciones de sangre de Drago (100%, 75% y 50%), digluconato de clorhexidina 0.12% y el control negativo agua destilada

Gráfico 1. Medias de halos de inhibición frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas en agar BHI



Según gráfico 1, se puede observar que la diferencia de las medias de los resultados de los halos de inhibición frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de incubación en agar BHI dando como resultados superiores a 0 por lo que se puede decir que si existe un efecto inhibitorio.

RESULTADOS ESPECIFICOS

- Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

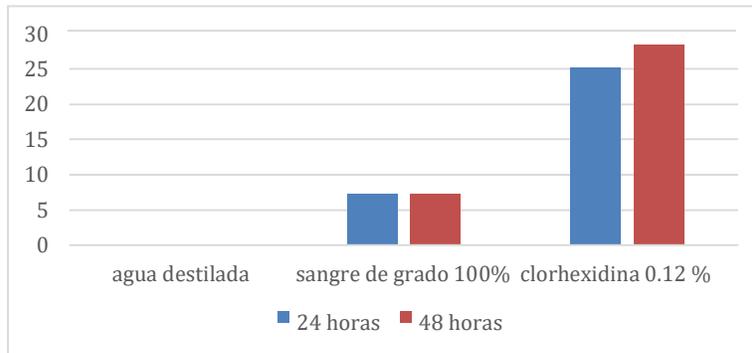
Tabla 2, Comparación de las mediciones de los halos de inhibición frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de grado 100%.

	N	Media	Desviación estándar	mínimo	Máximo
Agua destilada (24hrs)	16	0	0	0	0
Clorhexidina 0,12 % (24hrs)	16	25.20	2.49	21.50	31.10
Sangre de grado 100% (24hrs)	16	7.20	0.74	6.30	8.90
Agua destilada (48hrs)	16	0	0	0	0
Clorhexidina 0,12 % (48hrs)	16	28.40	2.54	21.70	31.40
Sangre de grado 100% (48hrs)	16	7.31	0.74	6.40	9

Según tabla 2, se puede observar que los valores mínimos, máximo y media de los conjuntos

de resultados de las sustancias de prueba son mayores y difieren de cero, por lo cual, se puede decir que las tres sustancias de prueba y el control positivo tienen efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Gráfico 2 comparación de las medias de halos de inhibición con una concentración al 100 %, agua destilada (control negativo) clorhexidina 0.12% (control positivo) en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas



Según gráfico 2, se puede observar que la diferencia de las medias de los resultados de los halos de inhibición del colutorio a base de sangre de grado en una concentración al 100 %, agua destilada y clorhexidina al 0.12 % frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de incubación en agar BHI. Se evidencia que el halo de inhibición del colutorio de sangre de grado es mayor al del agua destilada.

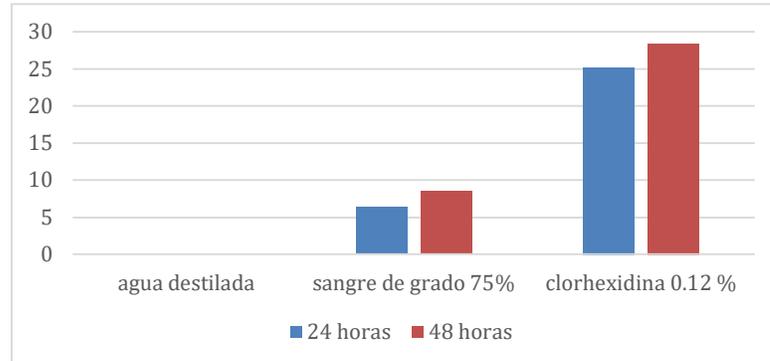
- Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

Tabla 3 Comparación de las mediciones de los halos de inhibición frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de grado 75%.

	N	Media	Desviación estándar	mínimo	Máximo
Agua destilada (24hrs)	16	0	0	0	0
Clorhexidina 0,12 % (24hrs)	16	25.20	2.49	21.50	31.10
Sangre de grado 75% (24hrs)	16	6.40	0.65	5.90	8.70
Agua destilada (48hrs)	16	0	0	0	0
Clorhexidina 0,12 % (48hrs)	16	28.40	2.54	21.70	31.40
Sangre de grado 75% (48hrs)	16	8.51	0.68	8	8.90

Según tabla 3, se puede observar que los valores mínimos, máximo y media de los conjuntos de resultados de las sustancias de prueba son mayores y difieren de cero, por lo cual, se puede decir que las tres sustancias de prueba y el control positivo tienen efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Gráfico 3 comparación de las medias de halos de inhibición con una concentración al 75 %, agua destilada (control negativo) clorhexidina 0.12% (control positivo) en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas



Según gráfico 3, se puede observar que la diferencia de las medias de los resultados de los halos de inhibición del colutorio a base de sangre de grado en una concentración al 75 %, agua destilada (control negativo) y clorhexidina 0.12 % (control positivo) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de incubación en agar BHI. Se evidencia que el halo de inhibición del colutorio de sangre de grado es mayor al del agua destilada.

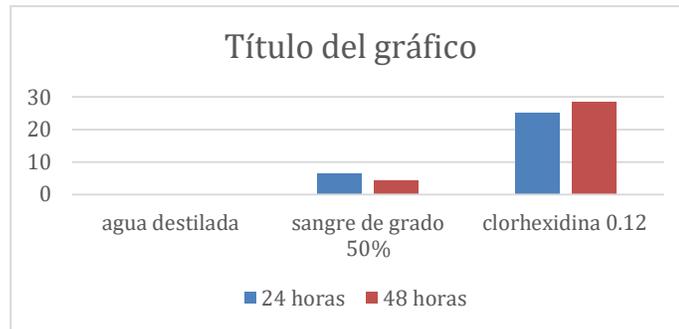
- Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

Tabla 4, Comparación de las mediciones de los halos de inhibición frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de grado 50%.

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Agua destilada (24hrs)	16	0	0	0	0
Clorhexidina 0,12 % (24hrs)	16	25.20	2.49	21.50	31.10
Sangre de grado 50% (24hrs)	16	6.25	0.34	6	7
Agua destilada (48hrs)	16	0	0	0	0
Clorhexidina 0,12 % (48hrs)	16	28.40	2.54	21.70	31.40
Sangre de grado 50% (48hrs)	16	6.36	0.37	6	7.20

Según tabla 4, se puede observar que los valores mínimos, máximo y media de los conjuntos de resultados de las sustancias de prueba son mayores y difieren de cero, por lo cual, se puede decir que las tres sustancias de prueba y el control positivo tienen efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Gráfico 4 Medias de halos de inhibición con una concentración al 50 % en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas



Según gráfico 4, se puede observar que la diferencia de las medias de los resultados de los halos de inhibición del colutorio a base de sangre de grado en una concentración al 50 %, agua destilada y clorhexidina 0.12 % frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de incubación en agar BHI. Se evidencia que el halo de inhibición del colutorio de sangre de grado es mayor al del agua destilada.

- la concentración mínima inhibitoria del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en la actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue la del 100 %, estudio invitro en el año 2022.

Tabla 5. CONCENTRACIÓN MININA INHIBITORIA.

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA					
REPLICAS	Determinación sensibilidad de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 frente a cinco (05) concentraciones de Sangre de Grado				
	100 %	75%	50 %	25 %	12.5 %
1	(*)	(+)	(+)	(+)	(+)
2	(*)	(+)	(+)	(+)	(+)

(*): No hay turbidez en caldo BHI.

(+): Si hay turbidez en caldo BHI

Según tabla 3, la concentración mínima inhibitoria frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se presenta para la concentración de 100%, puesto que no se evidenció turbidez (crecimiento bacteriano) en el tubo de ensayo. Por otro lado, para las concentraciones de 75%, 50%, 25% y 12,5%, no se evidenció efecto inhibitorio frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en los tubos de ensayo, los cuales presentaban turbidez, es decir, crecimiento bacteriano.

Tabla 6. concentración mínima bactericida

CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA							
Réplicas	Determinación sensibilidad de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 (*) frente a cinco (05) concentraciones de Sangre de Drago en UFC						
	100%	Dilución 75%	Dilución 50%	Dilución 25%	Dilución 12.5%	Control Positivo	Control Negativo
1	0	4	6	15	47	Incontable	0
2	0	6	12	21	65		

(*) Concentración de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 de estándar de McFarl)

Según tabla 6, la concentración mínima bactericida frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se presenta para la concentración de 100%, puesto que no se evidenció crecimiento de unidades formadoras de colonias en la placa Petri. Por otro lado, para las concentraciones de 75%, 50%, 25% y 12,5%, no se evidenció efecto bactericida frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en las placas Petri, los cuales presentaban unidades formadoras de colonias, demostrando crecimiento bacteriano.

4.1.1. Análisis de resultados

Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

Conclusión:

- Según la tabla 1 el colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* si tuvo un efecto inhibitorio.

Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

Conclusión:

- Según la tabla 2 el colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* si tuvo un efecto inhibitorio, según la tabla 6 el efecto inhibitorio fue absoluto.

Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

Conclusión:

- Según la tabla 3 si hubo un efecto inhibitorio del látex de *Crotón lechleri* a 75% frente a *Streptococcus mutans*, según la tabla 6 fue parcial, puesto que hubo crecimiento en caldo BHI, presentó recuento en placa.

Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

Conclusión:

- Según la tabla 4 si hubo un efecto inhibitorio del látex de *Crotón lechleri* a 50% frente a *Streptococcus mutans*, según la tabla 6 fue

parcial, puesto que hubo crecimiento en caldo BHI, presentó recuento en placa.

Determinar la concentración mínima inhibitoria del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en la actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

Conclusión:

- Según la tabla 5 y 6, la concentración mínima inhibitoria de sangre de Drago frente a *Streptococcus mutans* fue 100%.

4.1.2. Contrastación de hipótesis

Para la contrastación de hipótesis se aplicó la prueba estadística de T de studen, la utilización de esta herramienta es la adecuada para este tipo de estudio debido a las variables, se siguió el procedimiento general realizando una prueba general de una hipótesis y la decisión se tomó tomando el método general con la verificación del uso del método del valor de probabilidad P comparado con el valor de significancia 0.05.

1 HIPÓTESIS GENERAL

1. Prueba de hipótesis

H1; Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

H0: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

2. Elegir el nivel de significancia 0.05 y se calcula la prueba estadística.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

3. decisión: Según los resultados obtenidos en la estadística se rechaza la hipótesis nula y la alterna es válida

4. conclusión:

El valor mínimo, máximo y la media del conjunto de halos de inhibición de la sangre de Drago, en sus diferentes concentraciones, son mayores y difieren de cero. Por lo cual, existe actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente a *Streptococcus mutans*.

2 HIPÓTESIS ESPECIFICAS

1. Prueba de hipótesis

- H1: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.
- H0: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

2. Elegir el nivel de significancia 0.05 y se calcula la prueba estadística.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

3. decisión: Según los resultados obtenidos en la estadística se rechaza la hipótesis nula y la alterna es válida

4. conclusión:

El valor mínimo, máximo y la media del conjunto de halos de inhibición de la sangre de grado son mayores y difieren de cero. Por lo cual, existe actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente a *Streptococcus mutans*.

- H1: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.
- H0: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

2. Elegir el nivel de significancia 0.05 y se calcula la prueba estadística.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

3. decisión: Según los resultados obtenidos en la estadística se rechaza la hipótesis nula y la alterna es valida

4. conclusión:

El valor mínimo, máximo y la media del conjunto de halos de inhibición de la sangre de grado son mayores y difieren de cero. Por lo cual, existe actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente a *Streptococcus mutans*.

- H1: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *crotón lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

- H0: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *croton lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio in vitro en el año 2022.

2. Elegir el nivel de significancia 0.05 y se calcula la prueba estadística.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

3. decisión: Según los resultados obtenidos en la estadística se rechaza la hipótesis nula y la alterna es valida

4. conclusión:

El valor mínimo, máximo y la media del conjunto de halos de inhibición de la sangre de grado son mayores y difieren de cero. Por lo cual, existe actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente a *Streptococcus mutans*.

- H1: En una concentración mínima del colutorio a base de látex de *Crotón Lechleri*, Si hay actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.
- H0: En una concentración mínima del colutorio a base de látex de *Crotón Lechleri*, No hay actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

2. Elegir el nivel de significancia 0.05 y se calcula la prueba estadística.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

3. decisión: Según los resultados obtenidos en la estadística se rechaza la hipótesis nula y la alterna es válida

4. conclusión:

la concentración mínima bactericida frente a *Streptococcus mutans* se presenta para la concentración de 100%, puesto que no se evidenció crecimiento de unidades formadoras de colonias en la placa Petri.

4.2. Discusión de resultados

Las lesiones cariosas son de origen bacteriano, de carácter multifactorial, que causa el deterioro de las estructuras dentales, teniendo como un principalmente causante al *Streptococcus mutans*; El *Streptococcus mutans* es sensible ante la presencia de la clorhexidina sin embargo en el presente trabajo se buscó otras alternativas de tratamientos, para lo cual se escogió el látex de sangre de grado como una posible alternativa.

Al igual que la investigación que realizó CAYO C, este estudio determinó que el aceite el látex de la sangre de grado (*c. lechleri*) en una concentración al 100% posee una capacidad inhibidora bacteriana in vitro sobre las cepas de bacterias *Streptococcus mutans*, por medio de un ensayo microbiológico de Agar en pozo, Mientras que las concentraciones de 75% y 50 % no llegaron a tener resultados relevantes concordando

con la investigación de AVILÉS H, mientras que en la investigación de CAYO C. la concentración de sangre de grado presento halos de 1.7 mm en una concentración de 100% y no presentando halos en concentraciones menores del 40%, en esta investigación obtuvimos en concentraciones de 100 % halos de 7.3 mm y en concentraciones de 50 % halos de 6.2 mm.

Este estudio permite demostrar la propiedad antibacteriana de la sangre de grado (*C. lechleri*) en presencia de uno de los principales microorganismos que provocan la enfermedad periodontal concordando con la investigación de LAZO J. y TAMARIZ J. sobre la eficacia del látex de crotón lechleri como alternativa de tratamiento contra el *Streptococcus mutans*. Además, teniendo en consideración la gran aceptación de la medicina rural por la población y de acuerdo a las conclusiones se podría tener en consideración dentro de las medidas de prevención a la sangre de grado (*C. lechleri*).

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- El colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 posee actividad antibacteriana, estudio invitro en el año 2022.
- El colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 posee actividad antibacteriana, estudio invitro en el año 2022.
- El colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 posee actividad antibacteriana, estudio invitro en el año 2022.
- El colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 posee actividad antibacteriana a las, estudio invitro en el año 2022.
- La concentración al 100 % del *Crotón lechleri* es la concentración mínima inhibitoria del colutorio a base de látex de *Crotón lechleri* en la actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.

5.2 Recomendaciones

1. Proseguir con la investigación del látex de sangre de grado (*c. lechleri*) debido a su a su capacidad inhibitoria frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en un estudio “in vivo”.
2. Debería evaluarse la capacidad inhibitoria del látex de sangre de grado (*c. lechleri*) frente a diversas bacterias (Gram positivas y Gram negativas) para que de esta forma se cubrirá la gran mayoría del espectro bacteriano, frente a bacterias que hacen presencia clínicamente en la cavidad oral; para que logre ser una opción de tratamiento natural.
3. Desarrollar diversas investigaciones comparativas entre las diversas especies de sangre de grado.

Bibliografía

1. Resistencia a los antimicrobianos (ONLINE). Ginebra: OMS; 2018.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
2. MINSA. Estrategias y Metodologías de inversión para mejorar El Uso De Los Antimicrobianos En El Ámbito Hospitalario (ONLINE). Lima –Perú ;2007.
http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/documento_tecnico_ES TRATEGIAS_Y_METODOLOGIAS_DE_INTERVENCION_ATM.pdf
3. Sangre de grado. Biopat Perú (ONLINE) lima: INDECOPI. Rev. año 1, N 7 Julio 2015
https://www.indecopi.gob.pe/documents/20791/202940/07.Boletin_N7_SangreGrado.pdf/8265b1eb-f494-4db3-8dc4-ba72fe830155
4. Forero L. E. Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas. Santa Fe de Bogotá, DC (Colombia) 2000.
5. Piles Rutter, R.A. Catálogo De Plantas Útiles De La Amazonia Peruana. Instituto Lingüístico de verano. Yarinacocha, Perú. (5) 1990.
6. Control Microbiológico y Evaluación de la Actividad Antibacteriana In Vitro de Crotón Lechleri “Sangre de Grado”. (INTERNET) Artículo 2 Vol.3 N 2 ,2003
https://medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2003/Art2_Vol3_N1-2.pdf
7. Sidwell, R.; Huffman, J H.; ET ALL, Influenza virus - inhibitory effects of intraperitoneally and aerosol-administered SP-303, a plant flavonoid. Chemotherapy; 1994. Vol. 40: 42-50. 5.
8. Ubillas, R.; ET ALL, an antiviral oligomeric proantocyanidin form de latex of croton lechleri (Sangre de drago). Phytomedicine, 1994; Vol. 1: 77-106.
9. Lazo Chambilla, Extracto de Crotón Lechleri y de Pelargonium Robertianum en el Tratamiento de la Gingivitis (tesis para optar el grado de cirujano dentista). Lima-Perú: Universidad San Martin De Porres ;2007.

10. Chen, Z.; Cal, Y; ET ALL, Studies on the anti-tumour, anti-bacterial and woundhealing properties of dragon's blood. *Planta Medica*. 1994; Vol. 60: 541-545.
11. Gala Godoy, ET ALL. Potencial antimicrobiano del latex de *Crotón gossypifolius*, sobre especies asociadas a infecciones en humanos (Rev. *Arnaldoa* 27 (1): 247-256, 2020) Maracay-VENEZUELA: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, 2020.
12. José Luis Cruz Silva. Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Crotón lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pilory* (TESIS) Trujillo – Perú: Universidad Cesar Vallejo ;2020.
13. Jherlits Juniors Chininin Vílchez, ET ALL. Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del látex de *Crotón lechleri* “sangre de grado” frente a *Staphylococcus aureus* atcc 25923 (ARTICULO) Chimbote-Perú: Universidad San Pedro;2018.
14. Segura Sangucho Paola S. Efecto inhibitorio de dilución de sangre de drago y extracto hidroalcohólico de uña de gato frente a *porphyromona gingivalis*. estudio in vitro. (TESIS) Quito-Ecuador: Universidad Central Del Ecuador Facultad de Odontología ,2018.
15. Iván André Avilés Hidalgo, ET ALL; Actividad antibacteriana in vitro de *Croton lechleri* sobre *Streptococcus mutans* (Rev. *Odontol. Sanmarquina* 2018) Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología. Quito, Ecuador.
16. César Cayo.ET ALL. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del *Crotón lechleri* sobre cultivos de *Streptococcus mutans*. (artículo científico-UAP), enero-junio 2014.
17. Corrales L., Castillo A., ET ALL, Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Crotón lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *NOVA*; 2013. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v11n19/v11n19a05.pdf>.
18. José Huapaya Yaya, ET ALL. Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana in Vitro de *crotón lechleri* “Sangre de grado”. (ARTICULO) Lima - Perú: Universidad San Martín de Porres ;2017.
19. Tamariz J., Capcha R., Palomino ET ALL. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Crotón lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. *Rev Med Hered*; 2003. [internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n2/v14n2ao6.pdf>

20. Signoretto C, Bianchi F, ET ALL, Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(2):347-56
21. Liébana J. *Microbiología Oral.* 2da ed. Madrid: Mc Graw-Hill; 2002
22. Duque de Estrada Riverón J, Pérez Quiñonez JA, Hidalgo-Gato Fuentes3 I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana de Estomatología* [Internet]. 2006 [citado 15 de junio 2020];43(1):0-0. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/cum-29662>
23. Gill J. *Dental Caries: The Disease and its Clinical Management, Third Edition.* *British Dental Journal.* 2016;221(8):443-443. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2016.767>
24. Graciano ME, Correa YA, Martínez CM, Burgos A, Ceballos JI, Sánchez LF. *Streptococcus mutans* y caries dental en América Latina. Revisión sistemática de la literatura. *Revista Nacional de Odontología.* [Internet]. 2014[citado 16 de junio de 2020];8(14):32-45. Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/od/article/view/282>
25. Huanacune C, Haydeé R. Estudio Comparativo In Vitro sobre la Eficacia Antibacteriana del Extracto Alcohólico de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) al 40% y el Hipoclorito el Sodio al 5,25%; a las 24 y 48 Horas, sobre el *Enterococcus Faecalis*. Univ Priv Tacna 2019. Disponible en: <http://localhost:8080/xmlui/handle/UPT/966>
26. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 1 de febrero de 2015;23(2):76-82. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0966842X1400225X>
27. Duque de Estrada Riverón J, Pérez Quiñonez JA, Hidalgo-Gato Fuentes3 I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana de Estomatología* [Internet]. 2006 [citado 15 de junio 2020];43(1):0-0. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/cum-29662>
28. Gill J. *Dental Caries: The Disease and its Clinical Management, Third Edition.* *British Dental Journal.* 2016;221(8):443-443. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2016.767>
29. Kidd E, Fejerskov O. *Essentials of dental caries, Fourth edition.* Book review editorial *Fluoride* 2016;6. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.304>

30. Equipo de salud Parroquia Jesús Obrero. Aprendamos a curarnos con plantas. Ed. Tarea, 1 986;34.
31. Cerrutti T. Plantas Medicinales Cultivo, importancia y formas de uso. EsSalud - IMET! quitos, 2000;7 2-3
32. Marcelo AJ, Calderon C, ET ALL, Desarrollando Nuestra Diversidad Biocultural "Sangre de grado" y el Reto de su Producción Sustentable en el Perú. Lima: Gráficos S.R . Ltda, 1 999. 1' ed.
33. Alonso J R. Tratado de Fito medicina bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Ed. ISIS ediciones
34. Avalas DM, Cabanillas M L. Estudio fitoquímico del látex de *Crotón lechleri* "sangre de grado" y ensayo del efecto antibacteriano "in vitro" de su extracto hidroalcohólico. (Tesis). Universidad Nacional de Trujillo, 1994
35. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*. 1980 Jun;44(2):331-84.
36. . Castro AV. Inhibición del crecimiento in vitro de *streptococcus mutans* por papaina y sanitren. [Tesis]. Chile: Universidad de Chile; 2005.
37. Gutierrez PS. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la Odontología. Rev. Bogotá Pontificia Universidad Javeriana. 2006; 1(2)
38. Castro AV. Inhibición del crecimiento in vitro de *streptococcus mutans* por papaina y sanitren. (Tesis). Chile: Universidad de Chile; 2005

anexos

ANEXO 1

CARTA DE PRESENTACIÓN

Mgtr/Doctor: MG. ESP.

.....

Presente

Asunto: VALIDACIÓN DE INSTRUMENTOS A TRAVÉS DE JUICIO DE EXPERTO.

Es muy grato comunicarme con usted para expresarle mi saludo y así mismo, hacer de su conocimiento que, siendo estudiante del programa de titulación de bachilleres de otras universidades, requiero validar los instrumentos con los cuales recogeré la información necesaria para desarrollar mi investigación y con la cual optaré el grado de cirujano dentista.

El título nombre de mi proyecto de investigación es: “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLUTORIO A BASE DE LATEX DE CROTON LECHLERI Y EL STRETOCOCCUS MUTANS ATCC 25175” y siendo imprescindible contar con la aprobación de docentes especializados para aplicar los instrumentos en mención, he considerado conveniente recurrir a Usted, ante su connotada experiencia en temas de

El expediente de validación que le hago llegar contiene:

- Carta de presentación.
- Definiciones conceptuales de las variables y dimensiones.
- Matriz de operacionalización de las variables.
- Certificado de validez de contenido de los instrumentos.

Expresándole los sentimientos de respeto y consideración, me despido de Usted, no sin antes agradecer por la atención que dispense a la presente

Atentamente,

ROBERT BENJAMIN ASTUDILLO AQUINO

Nombre y Firma

D.N.I:47570408

Anexo 2

Instrumento / tabla de recolección de datos

Réplicas de Anfibiograma	ANTIBIOGRAMA									
	Halo de inhibición frente <i>Streptococcus mu/ans</i> ATCC 25175 (*) en milímetros (mm) en agar BHI									
	1: Sangre de Drago						CONTROL + Digluconato de Clorhexidina 0.12%		CONTROL - Aqua destilada	
	100%		Dilución 75%		Dilución 50%		24h	48h	24h	48h
	24h	48h	24h	48h	24h	48h				
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
10										
11										
12										
13										
14										
15										
16										

Anexo 3

Validación de instrumento

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

1.1 Apellidos y Nombres del Experto: CD Mg Carlos Javier Arauzo Sinchez

1.2 Cargo e Institución donde labora: Docente de la UPNW

1.3 Nombre del Instrumento motivo de evaluación: tabla de recolección de datos

1.4 Autor(es) del Instrumento: ROBERT ASTUDILLO AQUINO

1.5 Título de la Investigación: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLUTORIO A BASE DE LATEX DE CROTON LECHLERI Y EL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175"

II. ASPECTO DE LA VALIDACIÓN

	CRITERIOS	Deficiente 1	Baja 2	Regular 3	Buena 4	Muy buena 5
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.				X	
2. OBJETIVIDAD	Está expresado en conductas observables.			X		
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y tecnología				X	
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.				X	
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad en sus ítems.				X	
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del desarrollo de capacidades cognoscitivas.				X	
7. CONSISTENCIA	Alineado a los objetivos de la investigación y metodología.				X	
8. COHERENCIA	Entre los índices, indicadores y las dimensiones.			X		
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito del estudio				X	
10. PERTINENCIA	El instrumento es adecuado al tipo de Investigación.				X	
CONTEO TOTAL DE MARCAS (realice el conteo en cada una de las categorías de la escala)						
		A	B	C	D	E



Universidad
Norbert Wiener

$$\text{Coeficiente de Validez} = \frac{1 \times 0 + 2 \times 0 + 3 \times 2 + 4 \times 8 + 5 \times 0}{50} = 0,76$$

50

III. CALIFICACIÓN GLOBAL. (Ubique el coeficiente de validez obtenido en el intervalo respectivo y marque con un aspa en el círculo asociado)

Categoría	Intervalo
Desaprobado	[0,00 – 0,60]
Observado	<0,60 – 0,70]
Aprobado	<0,70 – 1,00]

(X)

IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

Proyecto de investigación aplicable

Lima, 07 de febrero del 2021



Firma y sello

Validación de instrumento



VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y Nombre del Experto: **ALVÁN SUANABAR PABLO GEMAR**
 1.2 Cargo e Institución donde labora: **UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER**
 1.3 Nombre del instrumento motivo de evaluación: **tabla de recolección de datos**
 1.4 Autor(es) del instrumento: **ROBERT ASTUDILLO AGUIÑE**
 1.5 Título de la investigación: **"ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLUTORIO A BASE DE LATEX DE CROTÓN LECHLERI Y EL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175"**

II. ASPECTO DE LA VALIDACIÓN

	Criterios	Criterios				
		Deficiente 1	Baja 2	Regular 3	Buena 4	Muy buena 5
1. CLARIDAD	Está formulado con lenguaje apropiado.				X	
2. OBSERVABILIDAD	Está expresado en conductas observables.				X	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y tecnología.					X
4. ORGANIZACIÓN	Es una organización lógica.				X	
5. SUFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad en sus ítems.				X	
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del desarrollo de capacidades cognitivas.				X	
7. CONSISTENCIA	Alineado a los objetivos de la investigación y metodología.					X
8. CORRELACIÓN	Entre los ítems, indicadores y los constructos.				X	
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito del estudio.					X
10. PERTINENCIA	El instrumento es adecuado al tipo de investigación.				X	
CUMISO TOTAL DE ÍTEMAS (realice el conteo en cada una de las categorías de la escala)					7	3
		A	B	C	D	E



$$\text{Coeficiente de Validez} = \frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{50} =$$

60

III. CALIFICACIÓN GLOBAL (Ubique el coeficiente de validez obtenido en el intervalo respectivo y marque con un aspa en el círculo adecuado)

Categoría	Intervalo
Desaprobado	[0,00 – 0,60]
Observado	<0,60 – 0,70]
Aprobado	<0,70 – 1,00]

IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

ES APLICABLE

SABADO, 25 de marzo del 2021

Pablo Alvan Suanabar

Mg.CD. PABLO ALVAN SUANABAR

Validación de instrumento



VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellido y Nombre del experto: MUAYLLAS FANDELES, DE LAZAR
 1.2 Cargo e Institución donde labora: UNIVERSIDAD NORBERT WIENER
 1.3 Nombre del instrumento motivo de evaluación: tabla de recolección de datos
 1.4 Autor(es) del instrumento: ROBERT ASTUDILLO AGUIÑO
 1.5 Título de la Investigación: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLIFORMO A BASE DE LA LIX DE CROTON LECHLERI Y EL STREPTOCOCCUS MUTANS AICC 25175"

II. ASPECTO DE LA VALIDACIÓN

	COMENTARIOS	Deficiente 1	Bajo 2	Regular 3	Buena 4	Muy Buena 5
1. CLARIDAD	Esta formulada con lenguaje apropiado.				X	
2. OBJETIVIDAD	Esta expresado en condiciones observables.				X	
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y tecnología.				X	
4. ORGANIZACIÓN	Esta una organización lógica.				X	
5. SUPLENENCIA	Comprende las aspectos de cantidad y calidad en sus datos.				X	
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para obtener aspectos del desarrollo de capacidades cognitivas.				X	
7. CONSISTENCIA	Afinado a las categorías de la investigación y metodología.				X	
8. CUMPLENCIA	Esta en relación, interrelación y las dimensiones.				X	
9. METODOLOGÍA	La metodología responde al propósito del estudio.				X	
10. PERTINENCIA	El instrumento se adecua al tipo de investigación.				X	
CUNTES TOTAL DE MARCAS (realice el conteo en cada una de las categorías de la escala)					10	
		A	B	C	D	E

$$\text{Coeficiente de Validez} = \frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{50} = 30$$

III. CALIFICACIÓN GLOBAL (Ubique el coeficiente de validez obtenido en el intervalo respectivo y marque con un x en el círculo asociado)

Categoría	Intervalo
Desaprobado	[0,00 – 0,60]
Observado	<0,60 – 0,70]
Aprobado	<0,70 – 1,00]

IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

Lima, 31 de enero del 2022

Prima y sello

Validación de instrumento



VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO

I. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y Nombres del Experto: Dr. Carlos Enrique Guillén Gatarza
 1.2 Cargo e Institución donde labora: Docente Universidad Norbert Wiener.
 1.3 Nombre del Instrumento motivo de evaluación: tabla de recolección de datos
 1.4 Autor(es) del Instrumento: ROBERT ASTUDILLO AQUINO
 1.5 Título de la Investigación: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLUTORIO A BASE DE LATEX DE CROTON LECHLERI Y EL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175"

II. ASPECTO DE LA VALIDACIÓN

	CRITERIOS	Deficiente 1	Baja 2	Regular 3	Buena 4	Muy buena 5
1. CLARIDAD	Esta formulado con lenguaje apropiado.					✘
2. OBJETIVIDAD	Esta expresado en conductas observables.					✘
3. ACTUALIDAD	Adecuado al avance de la ciencia y tecnología					✘
4. ORGANIZACIÓN	Existe una organización lógica.					✘
5. SUFFICIENCIA	Comprende los aspectos de cantidad y calidad en sus ítems.					✘
6. INTENCIONALIDAD	Adecuado para valorar aspectos del desarrollo de capacidades cognoscitivas.					✘
7. CONSISTENCIA	Alineado a los objetivos de la investigación y metodología.					✘
8. COHERENCIA	Entre los ítemes, indicaciones y las dimensiones.					✘
9. METODOLOGÍA	La estrategia responde al propósito del estudio					✘
10. PERTINENCIA	El instrumento es adecuado al tipo de Investigación.					✘
CONTEO TOTAL DE MARCAS						✘
(realice el conteo en cada una de las categorías de la escala)		A	B	C	D	E



Coefficiente de Validez = $\frac{(1 \times A) + (2 \times B) + (3 \times C) + (4 \times D) + (5 \times E)}{50}$

50

III. CALIFICACIÓN GLOBAL (Ubique el coeficiente de validez obtenido en el intervalo respectivo y marque con un xpa en el círculo asociado)

Categoría	Intervalo
Desaprobado	[0,00 – 0,60]
Observado	<0,60 – 0,70]
Aprobado	<0,70 – 1,00]

IV. OPINIÓN DE APLICABILIDAD:
ninguna

26 de Enero del 2022


 Carlos Enrique Guillén Gatarza
 Docente Universidad Norbert Wiener

Firma y sello

ANEXO 4

CERTIFICADO DE ANALISIS STREPTOCOCCUS MUTANS



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-32** Reference Number: ATCC® 25175™* Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2022/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Quevi Release Date: 2020/9/8
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2020-09-02T11:47:04.268 ads

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B10 (+++) (A)	266-32	Streptococcus mutans	2.14

Comments:

n/a

ANEXO 5

CERTIFICADO DE ELIMINACION DE RESIDUO



CONSTANCIA

La empresa SCIENTIFIC QUALITY S.A.C. hace constar que se ha eliminado adecuadamente los residuos biológicos del trabajo de Tesis "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLUTORIO A BASE DE LATEX DE CROTON LECHLERI Y EL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175" como indica nuestro Instructivo de Bioseguridad y eliminación de residuos biológicos del Laboratorio de microbiología I01-P10-GL, el cual indica que los materiales de ensayo biocontaminados se dividirán en materiales de vidrio y descartables. Ambos serán colocados, por separado, en bolsas de riesgo biológico y se colocarán en la autoclave para su proceso a 121°C por 30 minutos.

Luego del proceso de autoclavado, los materiales de vidrio se lavarán y pasarán controles de calidad para ser reutilizados. Con respecto al material descartable, al haber sido **minimizado, tratado,** eliminando el **riesgo significativo**; se realiza su **disposición final** como residuo sólido municipal según Ley N° 27314., Ley General de Residuos Sólidos. Título IV. Artículo 27, inciso 2, el cual dice:

"27.2 La prestación de servicios de residuos sólidos por pequeñas y microempresas estará restringida a los residuos del ámbito de la gestión municipal, conforme a las disposiciones reglamentarias que al efecto se dicten para promover su participación".

Lima, 29 de octubre del 2021

Miguel Elias Jazayr Vilcapena
Gerente de Laboratorio
C.R.P. 14090

ANEXO 5

Constancia de ejecución emitido por el laboratorio

CONSTANCIA

Dra. Brenda Vergara Pinto
Directora
E.A.P. Odontología – Universidad Norbert Wiener
Presente.

Estimada Doctora:

Es grato dirigirme a usted para comunicarle que el señor Robert Benjamín Astudillo Aquino con DNI 47570408, bachiller en Odontología de la E.A.P. que usted dirige, realizó las pruebas microbiológicas del estudio experimental in vitro titulado: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL COLUTORIO A BASE DE LATEX DE CROTON LECHLERI Y EL STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175". Dicho estudio corresponde a su tesis para obtener el título de Cirujano dentista.

Toda la experimentación y recolección de datos fue realizada entre los días 14 al 22 de octubre del presente año y fue supervisado en su totalidad por mi persona, cumpliendo con todos los protocolos de bioética, bioseguridad y control de infecciones requeridos.

Sin otro particular.

Atentamente

Lima, 29 de octubre del 2021




Mbigo, Oniel Elias Jusrez Wilcapuma
Gerente de Laboratorio
C.B.P. 14090

ANEXO 6

turnitin

Tesis

NOMBRE DE ORIGINALIDAD			
19%	19%	2%	4%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS		
1	repositorio.uwienr.edu.pe	4%
2	repositorio.unfv.edu.pe	1%
3	repositorio.uigv.edu.pe	1%
4	repositorio.uap.edu.pe	1%
5	www.medicina.usmp.edu.pe	1%
6	www.dspace.uce.edu.ec	1%
7	repositorio.unap.edu.pe	1%
8	revistas.uap.edu.pe	1%
9	www.researchgate.net	1%

10	www.scielo.org.pe	1%
11	repositorio.uss.edu.pe	1%
12	repositorio.uladech.edu.pe	1%
13	repositorio.udh.edu.pe	1%
14	1library.co	1%
15	repositorio.ucv.edu.pe	<1%
16	repositorio.unheval.edu.pe	<1%
17	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS	<1%
18	aprenderly.com	<1%
19	www.ipen.gob.pe	<1%
20	hdl.handle.net	<1%
21	Submitted to Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion	<1%

Trabajo del estudiante	
22	pesquisa.bvsalud.org
23	www.scribd.com
24	cybertesis.unmsm.edu.pe
25	doaj.org
26	riul.unanleon.edu.ni:8080
27	dspace.ucuenca.edu.ec
28	repositorio.upao.edu.pe

Excluir citas Activar Excluir coincidencias < 10 words
 Excluir bibliografía Activar

Anexo 7

Matriz de consistencia

Matriz de consistencia				
Problemas de investigación	Objetivos de investigación	Hipótesis de investigación	variables	Tipo de investigación
Problema general	Objetivo general	Hipótesis general		
¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?	Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.	<p>HI: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p> <p>HI: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p>		
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis específicas	Variable independiente:	Aplicada
¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?	Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.	<p>HI: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p> <p>HI: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 100 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p>	Actividad antibacteriana del colutorio a base de aceite esencial de <i>Crotón lechleri</i>	experimental
¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?	Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.	<p>HI: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p> <p>HI: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 75 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p>	Variable dependiente:	longitudinal in vitro
¿Cuál es la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?	Determinar la actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.	<p>HI: Si hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p> <p>HI: No hay actividad antibacteriana del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en una concentración de 50 % mediante el método de disco de difusión en agar frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p>	<i>Streptococcus mutans</i>	
¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en la actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022?	Determinar la concentración mínima inhibitoria del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i> en la actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.	<p>HI: En una concentración mínima del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i>, si hay actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p> <p>HI: En una concentración mínima del colutorio a base de látex de <i>Crotón lechleri</i>, no hay actividad antibacteriana mediante el método de micro dilución frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, estudio invitro en el año 2022.</p>		

Anexo 8

Tabla de recolección de datos

Instrumento / tabla de recolección de datos

Réplicas de Anfibiotoma	ANTIBIOGRAMA									
	Halo de inhibición frente <i>Streptococcus mu/ans</i> ATCC 25175 (°) en milímetros (mm) en agar BHI									
	¥1: Sangre de Drago						CONTROL + Digluconato de Clorhexidina 0.12%		CONTROL - Aqua destilada	
	100%		Dilución 75%		Dilución 50%					
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24h	48h	24 h	48 h
1	8.9	9.0	6.2	6.3	6.4	6.5	28.6	28.9	0	0
2	7.9	8.0	6.3	6.5	6.0	6.1	26.7	27.0	0	0
3	7.2	7.3	6.2	6.3	6.1	6.2	24.0	24.2	0	0
4	6.3	6.4	6.0	6.1	6.2	6.3	24.2	24.3	0	0
5	6.9	7.0	6.5	6.6	6.0	6.1	23.8	23.9	0	0
6	7.2	7.3	6.1	6.1	6.3	6.4	25.5	25.7	0	0
7	7.8	8.0	6.3	6.4	6.0	6.1	26.8	27.0	0	0
8	6.5	6.6	6.1	6.2	6.8	7.0	26.5	26.7	0	0
9	7.3	7.4	6.2	6.3	6.1	6.2	26.8	27.0	0	0
10	7.9	8.0	6.3	6.4	6.0	6.1	23.9	24.1	0	0
11	8.1	8.2	8.7	8.9	6.9	7.0	21.5	21.7	0	0
12	6.4	6.5	6.0	6.1	6.1	6.1	23.8	23.9	0	0
13	6.3	6.4	6.5	6.6	6.0	6.1	23.6	23.7	0	0
14	6.8	7.0	6.9	7.0	7.0	7.2	21.5	21.7	0	0
15	6.7	6.8	6.3	6.4	6.0	6.0	31.1	31.4	0	0
16	7.0	7.1	5.9	6.0	6.2	6.3	25.0	25.2	0	0

Anexo 9

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS - SPSS Versión 22

Distribución de los grupos de estudio experimental y control de las sustancias de prueba in vitro a las 24 y 48 horas

Grupo de estudio	Frecuencia		Porcentaje
	24 horas	48 horas	
Grupo experimental A: Sangre de Drago 100%	16	16	20%
Grupo experimental B: Sangre de Drago 75%	16	16	20%
Grupo experimental C: Sangre de Drago 50%	16	16	20%
Grupo Control Positivo: Digluconato de clorhexidina 0.12%	16	16	20%
Grupo Control Negativo: Agua destilada	16	16	20%
Total	80	80	100%



*Cada grupo de estudio y control presentan la misma cantidad de datos. El número de réplicas de los halos de inhibición de Sangre de Drago a 100% a las 24 y 48 horas representa el 20 % de los datos totales. De igual manera, las réplicas de los halos de inhibición de la sangre de Drago 75%, sangre de Drago 75%, sangre de Drago 50%, digluconato de clorhexidina al 0.12% y del agua destilada, cada uno de esos grupos representa el 20% del total en ambos periodos de tiempo: 24 y 48 horas.

Comparación de estadísticos descriptivos de las mediciones en réplicas de los halos de inhibición frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de drago 100%, sangre de Drago 75%, sangre de Drago 50% y digluconato de clorhexidina 0.12%.

	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Sangre_Drago_100_48h	16	7,3125	,74822	6,40	9,00
Sangre_Drago_75_48h	16	6,5125	,68301	6,00	8,90
Sangre_Drago_50_48h	16	6,3563	,37766	6,00	7,20
Clorhexidina_0.12_48h	16	25,4000	2,54113	21,70	31,40
Sangre_Drago_100_24h	16	7,2000	,74565	6,30	8,90
Sangre_Drago_75_24h	16	6,4063	,65673	5,90	8,70
Sangre_Drago_50_24h	16	6,2563	,34248	6,00	7,00
Clorhexidina_0.12_24h	16	25,2063	2,49732	21,50	31,10

*Se puede observar que los valores mínimos, máximo y media de los conjuntos de resultados de las sustancias de prueba son mayores y difieren de cero, por lo cual, se puede decir que las tres sustancias de prueba y el control positivo tienen efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Por otro lado, se puede concluir que, según los valores de desviación estándar obtenidos de cada grupo de resultados, el conjunto de resultados que tiene mayor dispersión con respecto a la media es el digluconato de clorhexidina a 0.12% a las 48 horas y el conjunto de resultados que presenta la menor dispersión con respecto a la media es la sangre de Drago a 50% a las 24 horas.

ANÁLISIS DE NORMALIDAD DE RESULTADOS

Análisis de Normalidad de las diferencias de los halos de inhibición frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas de sangre de drago 100%, sangre de Drago 75%, sangre de Drago 50% y digluconato de clorhexidina 0.12%.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DIF_SANGRE100_24H_SANGRE100_48H	,518	16	,000	,398	16	,000
DIF_SANGRE75_24H_SANGRE75_48H	,431	16	,000	,612	16	,000
DIF_SANGRE50_24H_SANGRE50_48H	,375	16	,000	,697	16	,000
DIF_CLORHEXIDINA_24H_CLORHEXIDINA_48H	,287	16	,001	,807	16	,003

*Se infiere que el conjunto de resultados de los diferencias de los halos de inhibición de las sustancias de prueba a las 24 y 48 horas frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 no presentan una distribución normal, puesto que los p-valor (sig.) obtenidos para sangre de Drago a 100% (sig: 0,00), sangre de Drago a 75% (sig: 0.00), sangre de Drago a 50% (sig: 0,00) y digluconato de clorhexidina 0.12% (sig: 0,03) son menores a el nivel de significancia (0,05) en la prueba de normalidad de Shapiro Wilk. Se consideró para este de normalidad la prueba de Shapiro Wilk puesto que los datos analizados son menores a 50. La prueba de Kolmogorov- Smirnov es para datos mayores a 50. Se puede concluir que como se presentan grupos de datos con distribución no normal, se recomienda usar Estadísticos no paramétricos para analizar los datos.

PRUEBA DE RANGO CON SIGNO DE WILCOXON

Prueba de rango con signo de Wilcoxon ($p=0.05$) para las diferencias de los halos de inhibición frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas en agar BHI de sangre de drago 100%, sangre de Drago 75%, sangre de Drago 50% y digluconato de clorhexidina 0.12%.

	Sangre_Drag o_100_24h - Sangre_Drag o_100_48h	Sangre_Drag o_75_24h - Sangre_Drag o_75_48h	Sangre_Drag o_50_24h - Sangre_Drag o_50_48h	Clorhexidina_ 0.12_24h - Clorhexidina_ 0.12_48h
Z	-3,819 ^b	-3,690 ^b	-3,557 ^b	-3,598 ^b
Sig. asintótica (bilateral)	,000	,000	,000	,000

*Existen diferencias significativas entre las lecturas de los halos de inhibición analizando con la prueba de rango con signo de Wilcoxon a las 24 y 48 horas para cada sustancia de prueba, puesto que el p-valor (sig.) se han obtenido menores del nivel de significancia (0.05).

PRUEBA DE U MANN WHITNEY

Prueba de prueba de U Mann Whitney ($p=0.05$) para las diferencias de los halos de inhibición frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en milímetros (mm) a las 24 y 48 horas en agar BHI de sangre de drago 100%, sangre de Drago 75%, sangre de Drago 50% y digluconato de clorhexidina 0.12%.

	Sangre_Drag o_100_24h_ Sangre_75_2 4h	Sangre_Drag o_100_48h_ Sangre_75_4 8h	Sangre100_2 4h_Sangre50 _24h	Sangre75_24 h_Clorhexidin a_24h	Sangre_Drag o_75_24h_5 angre_50_24 h	Sangre100_4 8h_Sangre50 _48h	Sangre_75_4 8h_Clorhexidi na_48h	Sangre_75_4 8h_Sangre_ 50_48h	Sangre_Drag o_50_24h_Cl orhexidina_2 4h	Sangre_Drag o_50_48h_Cl orhexidina_4 8h	Clorhexidina_ 24h_Sangre_ Drago_100_2 4h	Clorhexidina_ 48h_Sangre_ Drago_100_4 8h
U de Mann-Whitney	32,500	33,500	23,000	,000	102,500	23,500	,000	102,500	,000	,000	,000	,000
W de Wilcoxon	168,500	169,500	159,000	136,000	238,500	159,500	136,000	238,500	136,000	136,000	136,000	136,000
Z	-3,815	-3,575	-3,976	-4,833	-,974	-3,969	-4,833	-,976	-4,843	-4,844	-4,827	-4,830
Sig. asintótica (bilateral)	,000	,000	,000	,000	,330	,000	,000	,329	,000	,000	,000	,000

*Existen diferencias significativas entre las lecturas de los halos de inhibición analizando con la prueba de U de Mann Whitney para las sustancias de prueba de sangre de Drago 100% y sangre de Drago 75% (sig: 0.00), sangre de Drago 100% y sangre de Drago 50% (sig: 0.000), sangre de Drago 100% y digluconato de clorhexidina a 0.12% (sig: 0.000), sangre de Drago 75% y digluconato de clorhexidina a 0.12% (sig: 0.000), sangre de Drago 50% y digluconato de clorhexidina a 0.12% (sig: 0.000) a las 24 y 48 horas. No hubo diferencia significativa en la comparación de pares del sangre de Drago 75% y sangre de Drago 50% a las 24 (sig: 0.330), ni a las 48 horas (sig: 0.329). Cabe recordar que si el p-valor (sig.) es menor a 0.05 (nivel de significancia) quiere decir que existe diferencia significativa entre los conjuntos de datos. Si el valor de p es mayor al nivel de significancia, significa que no existen diferencias en los conjuntos de datos.

Anexo 10

Fotos de equipo y materiales

AUTOCLAVE



INCUBADORA



REGLA VERNIER



MICROPIPETA



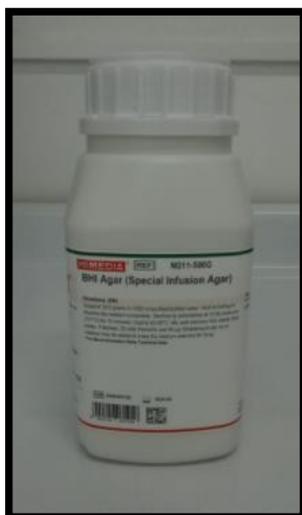
CONTADOR DE COLONIAS



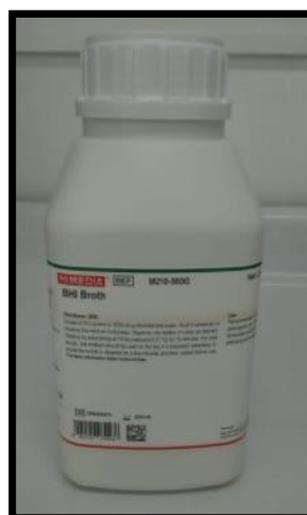
BAÑO TERMOSTÁTICO



MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

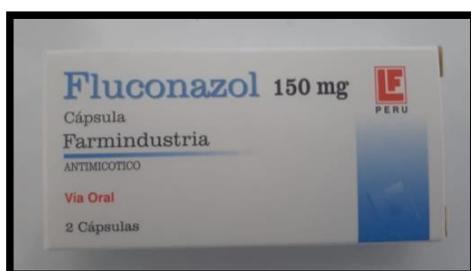


AGAR BHI



CALDO BHI

Fluconazol



Sangre de Drago



Digluconato de Clorhexidina 0.12%

. Agua destilada.



Empaques de bioseguridad de la cepa *streptococcus mutans* atcc25175



Discos antibiograma de 6mm

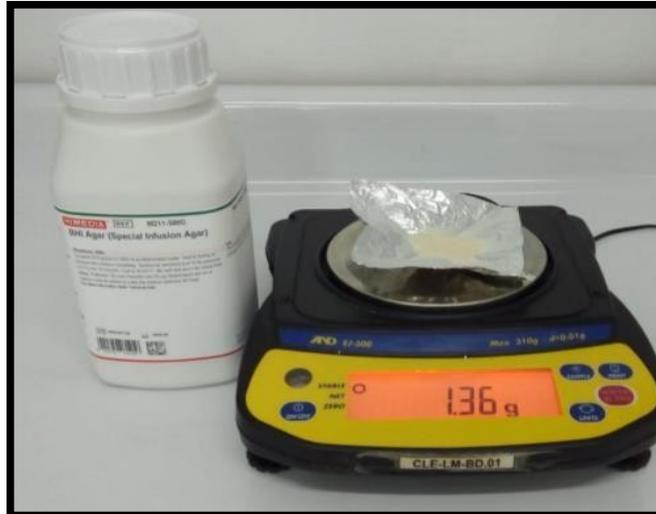


Estándar de turbidez de McFarland N°0.5



2. PREPARACION DEL AGAR BHI:

PESAJE DEL AGAR BHI



Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en esterilidad frente a mechero bunsen en caldo BHI:



Colocación de los discos en las placas cultivadas con *Streptococcus mutans* ATCC 25175 con pinza estéril



6. Procedimiento de inoculación de 15uL de las sustancias de prueba con Sangre de Drago (Aceite esencial de *Croton lechleri*), Digluconato de Clorhexidina 0.12% y agua destilada con micropipeta, en esterilidad, frente al mechero de bunsen

Inoculación de Sangre de Drago concentración de 100% (látex de *Croton lechleri*)



Inoculación de Digluconato de Clorhexidina 0.12%



Inoculaciones



1. Homogenizando con Vórtex las diluciones de sangre de grado
2. Inoculando, con micropipeta, en los discos antibiograma control de agua destilada
3. Colocación de las placas Petri con agar BHI inoculadas con *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y con los discos antibiograma conteniendo las sustancias de prueba en las jarras de anaerobiosis antes de proceder con la incubación

Jarra de anaerobiosis: Se observa la generación de CO₂, por combustión de una vela, para generar anaerobiosis en el ambiente interno de la jarra.

Cuando el ambiente interno de jarra sea anaerobio y termina la combustión de la vela, se procede a incubar.



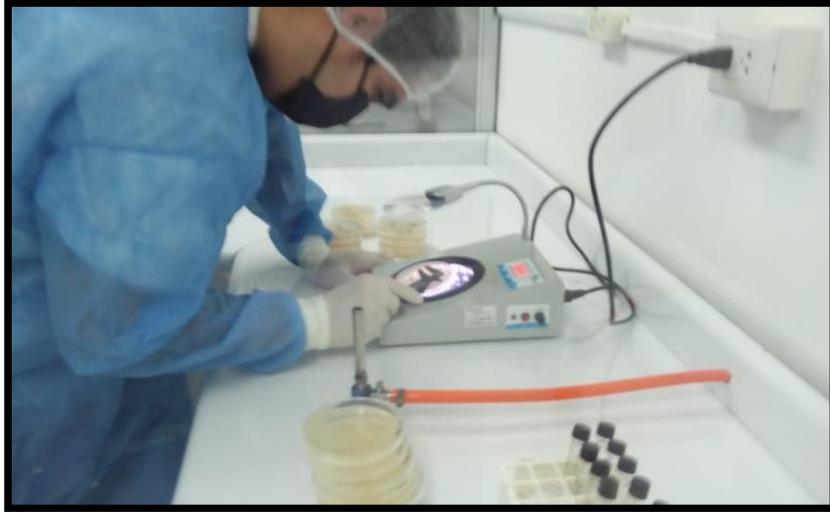
Incubación de las jarras de anaerobiosis en la incubadora de 37°C durante 24 y 48 horas



RESULTADOS

Después del tiempo de incubación, las placas Petri se sacan de las jarras de anaerobiosis y se miden con una regla Vernier y una lupa de 4 aumentos de un contador de colonias de fondo oscuro que dará contraste para observar detalladamente los halos de inhibición de las sustancias de prueba frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Medición de halos de inhibición con Regla vernier y en contador de colonias de fondo oscuro con lupa de 4 aumentos

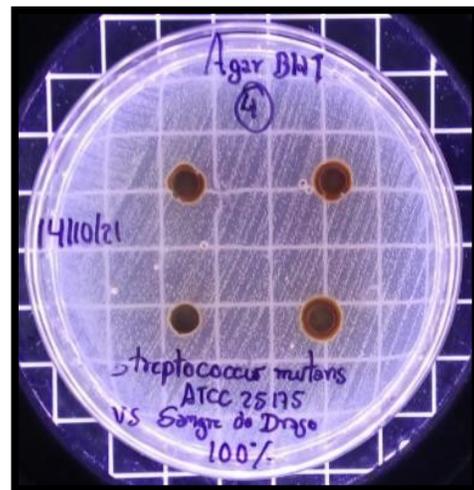
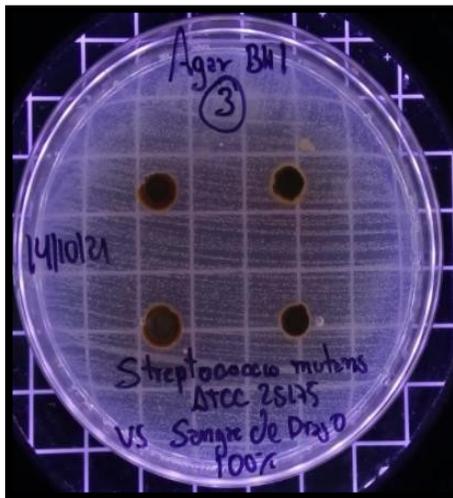


Conjunto de las placas cultivadas con Sangre de Drago a diferentes concentraciones 100%, 75%, 50% frente Streptococcus mutans ATCC 25175

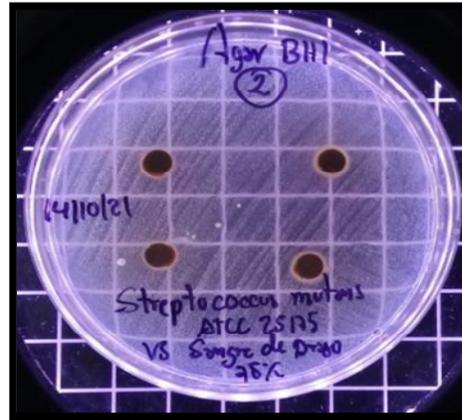


Fotos de placas Petri con 16 discos antibiograma inoculados 15uL con

Sangre de Drago de concentración 100%



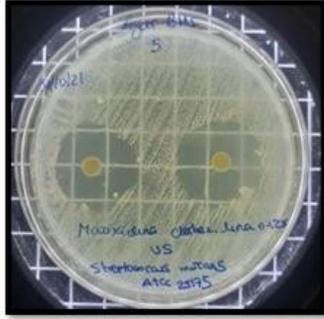
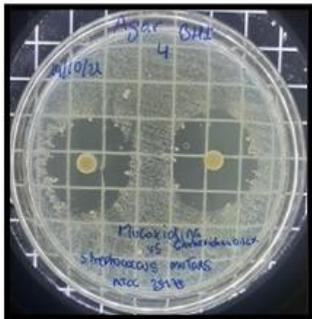
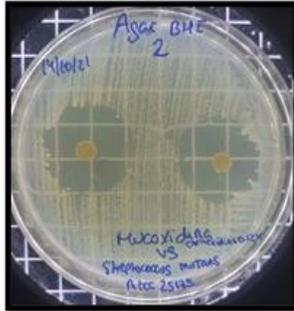
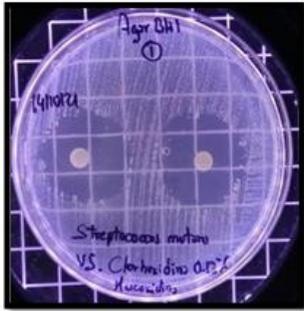
Fotos de placas Petri con 16 discos antibiograma inoculados 15uL con Sangre de Drago de concentración 75%



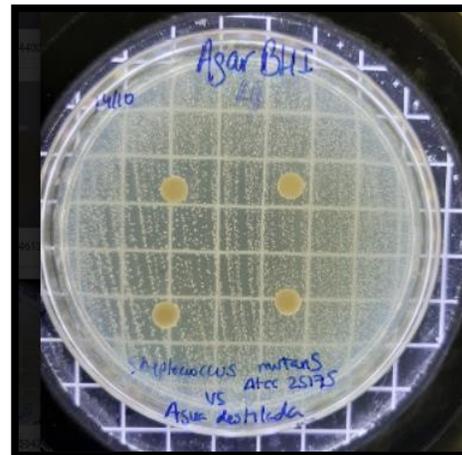
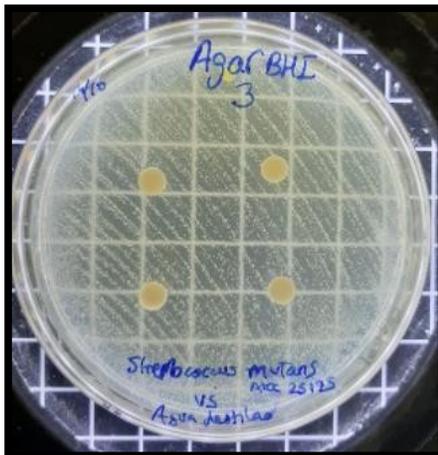
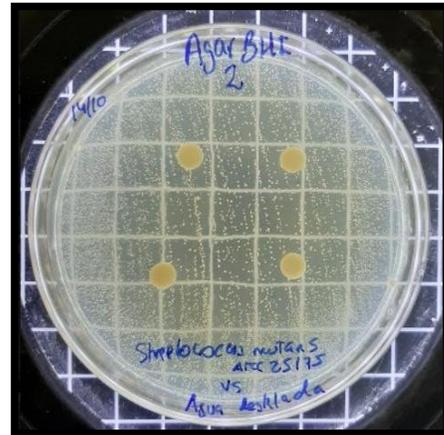
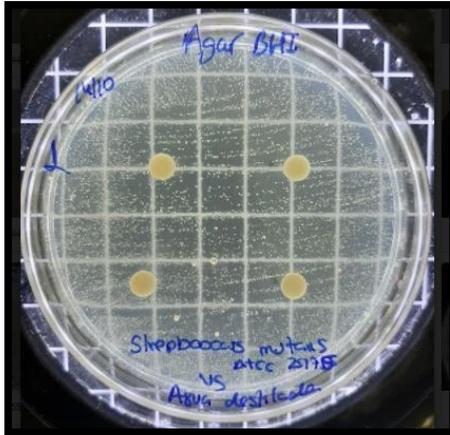
Fotos de placas Petri con 16 discos antibiograma inoculados 15uL con Sangre de Drago de concentración 50%



Fotos de placas Petri con 16 discos antibiograma inoculados 15uL con Digluconato de Clorhexidina al 0.12%

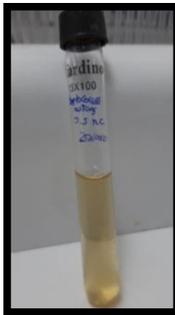


Fotos de placas Petri con 16 discos antibiograma inoculados 15uL con Agua destilada



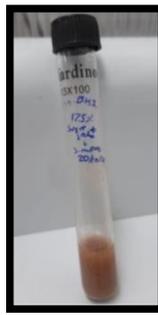
Concentración mínima inhibitoria

Primera Fase: Inoculación de Streptococcus mutans (100uL) a las concentraciones de prueba de sangre de Drago e incubados en anaerobiosis a 37°C por 24 horas

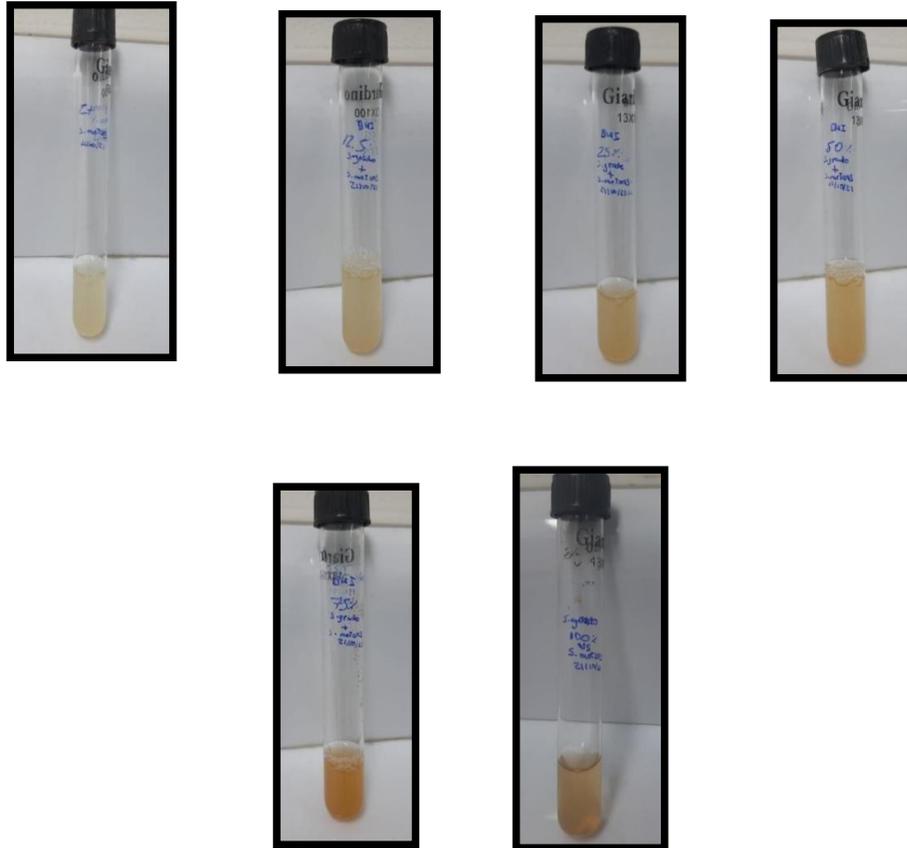


Sangre de grado 75% vs S. mutans

Sangre de grado 50% vs S. mutans



Segunda Fase: Inoculación de los cultivos (10uL) de 24 horas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 incubados con las concentraciones de prueba de sangre de Drago en anaerobiosis a 37°C en caldo BHI estéril.



Control positivo: *S. mutans* (turbidez)

Concentración de 12.5%, 25% ,50% ,75% *S. mutans* (turbidez)

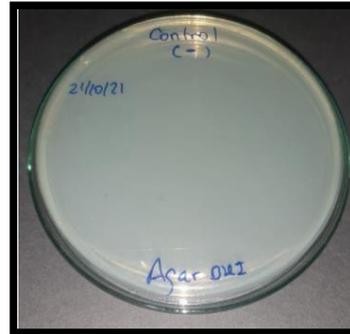
Concentración de 100% *S. mutans* (Sin turbidez)

Turbidez: Crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en caldo BHI.

Sin turbidez: No se evidencia crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en caldo BHI.

Concentración mínima bacteriostática de diferentes concentraciones de sangre de Drago frente a Streptococcus mutans ATCC 25175

Control positivo



Concentración 75%

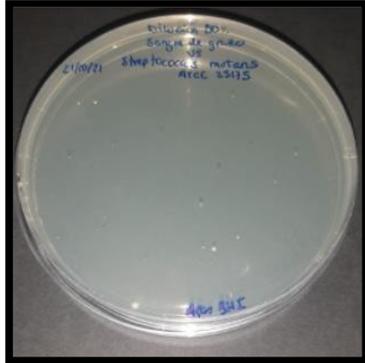
Control negativo



Concentración 100%



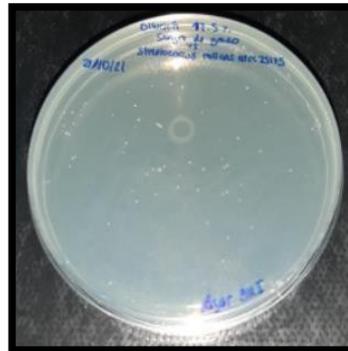
Concentración al 50%



Concentración al 12.5%



Concentración al 25%



ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS BIOLÓGICOS DEL ENSAYO.

Las placas Petri y otros residuos biológicos se colocaron en bolsas rojas y se autoclavaron según procedimiento.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
DIF_SANGRE100_24H_SANGRE100_48H	,518	16	,000	,398	16	,000
DIF_SANGRE75_24H_SANGRE75_48H	,431	16	,000	,612	16	,000
DIF_SANGRE50_24H_SANGRE50_48H	,375	16	,000	,697	16	,000
DIF_CLORHEXIDINA_24H_CLORHEXIDINA_48H	,287	16	,001	,807	16	,003

