



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO DE ODONTOLOGÍA

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* (maca) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)

TESIS

Para optar el título profesional de Cirujano Dentista

AUTORES

Alvitez Jurado, Maricielo (0000-0002-4486-1668)

Cardenas Cabanillas, Veronica Lucia (0000-0002-3113-7355)

ASESOR

. Juana Mercedes Del Valle Mendoza (0000-0002-6011-5040)

Lima, 29 de Octubre del 2020

DEDICATORIA

Dedico este proyecto a las personas que más amo, mis padres Otto y Sixta, quienes supieron guiarme y brindarme todo su apoyo para poder llegar a culminar esta etapa. Ustedes me vieron ingresar a esta carrera con tantos miedos, pero siempre me repetían: “todo está en la mente”. Solo tengo palabras de agradecimiento y este logro es para ustedes por todo el esfuerzo que hicieron por mí.

A Dios por guiar mi camino y por permitirme avanzar día a día.

Maricielo Alvitez Jurado

Dedico este proyecto primero a Dios por iluminar mi camino y ser mi fortaleza en todo.

A mis padres Edgardo y Carmen, quienes brindarme su apoyo incondicional en esta carrera. Ustedes me ayudaron a seguir día a día cada etapa universitaria, estuvieron en los momentos que más lo he necesitado y sobre todo nunca perdieron su confianza en mí,

A mi hermana stephanny por su motivación en todo el proceso de mi carrera.

A Joel H. y mi hijo Benjamín que son la familia que me dio la vida y por ser quienes me motivan a seguir adelante en cada meta que me propongo.

Verónica Lucia Cárdenas Cabanillas

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiar nuestro camino y permitirnos cerrar esta etapa de nuestra vida.

A nuestros padres y hermanos quienes nos brindaron su apoyo incondicional.

A nuestros asesores Juana del Valle, Miguel Ángel Aguilar y Leslie Casas por su cariño, paciencia, apoyo y por impulsarnos a mejorar durante toda esta etapa.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* en sus tres ecotipos (maca roja, amarilla y negra) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Materiales y Métodos: Este estudio *in vitro* utilizó pocillos embebidos del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* en sus tres ecotipos colocados en 7 placas petri que contenían cepas de cultivos. La Concentración mínima inhibitoria (CMI) fue evaluada por la técnica de Kirby Bauer y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante el Recuento de Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Los halos de inhibición se midieron en mm y se registraron mediante estadística descriptiva media y desviación estándar.

Resultados: Frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), la maca roja tuvo una media (+- d.e) de 13.5 ± 0.60 mm, MIC de 125.0µg/ml y MBC de 62.5 µg/ml; la maca negra 13.3 ± 0.53 mm, 125.0µg/ml y 62.5 µg/ml, respectivamente; y, la amarilla, 12 ± 0.27 mm, 250.0 µg/ml y 125.0 µg/ml, respectivamente. Frente al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), la media (+- d.e) de la maca roja fue 17.6 ± 0.23 mm, MIC de 62.5µg/ml y MBC de 31.3 µg/ml; la maca negra 19.6 ± 0.44 mm, 62.5µg/ml y 31.3 µg/ml, respectivamente; y, la amarilla 14.8 ± 0.26 mm, 31.3 µg/ml y 15.6 µg/ml, respectivamente.

Conclusión: Existe efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Lepidium meyenii* en sus tres ecotipos sobre los microorganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Palabras clave: Lepidium; Caries Dental; Antibacteriano; Bacterias.

In vitro evaluation of the antibacterial effect of methanolic extract of *Lepidium meyenii* (maca) on *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) strains

ABSTRACT

Objective: To evaluate the *in vitro* antibacterial effect of methanolic extract of *Lepidium meyenii* in its three ecotypes (red, yellow and black maca) against *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Materials and Methods: This *in vitro* study used wells embedded in methanolic extract of *Lepidium meyenii* in its three ecotypes, placed on 7 petri discs containing the bacteria samples. The Minimum inhibitory concentration (MIC) was evaluated using the Kirby Bauer technique and the minimum bactericidal concentration (MBC) using the colony forming unit (CFU). Inhibition halos were measured in mm and analyzed using descriptive statistics and standard deviation.

Results: Against *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), the red maca had a mean result (\pm sd) of 13.5 ± 0.60 mm, 125.0ug/ml MIC and 62.5ug/ml MBC; the black maca was 13.3 ± 0.53 mm, 125.0ug/ml MIC and 62.5 ug/ml MBC; and the yellow maca was 12 ± 0.27 mm, 250.0 ug/ml and 125.0 ug/ml, respectively. Against *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), the mean (\pm d.e) of the red maca was 17.6 ± 0.23 mm, 62.5ug/ml MIC and 31.3 ug/ml MBC; the black maca was 19.6 ± 0.44 mm, 62.5ug/ml MIC and 31.3 ug/ml MBC, and the yellow maca was 14.8 ± 0.26 mm, 31.3 ug/ml and 15.6 ug/ml, respectively.

Conclusion: Exists an antibacterial effect of methanolic extract of *Lepidium meyenii* in its three ecotypes against *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) and *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Keywords: Lepidium; Dental caries; Antibacterial; Bacteria.

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN	1
2	MATERIALES Y MÉTODOS	3
3	RESULTADOS	10
4	DISCUSIÓN	16
5	CONCLUSIONES	21
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
7	ANEXOS	25

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto metanólico del <i>Lepidium meyenii</i> (maca) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556).....	12
Tabla 2 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto metanólico del <i>Lepidium meyenii</i> (maca) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556).....	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto metanólico del <i>Lepidium meyenii</i> (maca) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556).....	13
Figura 2 Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto metanólico del <i>Lepidium meyenii</i> (maca) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556).....	15
Figura 3 Evaluación del efecto citotóxico del extracto metanólico del <i>Lepidium meyenii</i> (maca) sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) y <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556).....	16

1 INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) refiere que existen 5000 millones de personas en todo el mundo que han sufrido o sufren de caries dental, esto quiere decir que es la enfermedad de mayor prevalencia en la cavidad oral y que continúa afectando a la población en un 90%.^(1,2) Además, se considera que dentro de este porcentaje muchos de los niños, jóvenes y adultos han perdido dientes a causa de este problema, de los cuales se encuentran una alta incidencia en la población escolar, siendo este un 40%.^(3,4) La caries dental, aparte de ser de origen multifactorial tiene muchas características que pueden apreciarse a simple vista, como la desmineralización de la superficie del esmalte ocasionada por la adherencia de bacterias en las superficies dentales.^(5,6) Varias de las bacterias que permiten el desarrollo de una lesión incipiente (aún reversible) a una irreversible se encuentran en el biofilm bacteriano, claros ejemplos son las bacterias *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.

Un estudio hecho el 2018 por el Seguro Social de Salud (EsSalud), refiere que en el Perú se emplea la medicina natural o alternativa a beneficio de la salud, la cual se ha visto muy utilizada por la población de Lima Metropolitana.^(7,8) La fitoterapia es una ciencia que estudia el uso de las plantas para fines terapéuticos.^(9,10) Dentro de las plantas que presentan algún efecto antibacteriano se encuentra el *Lepidium meyenii* (maca) con sus 13 ecotipos que van de blanco a negro, definidos así por la coloración externa de su raíz, siendo 3 de estos los más conocidos y consumidos en el territorio peruano: amarilla, roja y negra.⁽¹¹⁻¹⁴⁾ Estas últimas son también conocidas por el nombre de su subcategoría; amarilla, Ccello; roja, Puka y negra como Yana, las cuales son empleadas en sus distintas presentaciones (maca en polvo, polvo gelatinizada, maca en líquido, encapsulada). Se conoce que la maca está compuesta por: alcaloides, aminoácidos, sales minerales, esteroides, saponinas, riboflavina, flavonoides, etc.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ De estos componentes, los polifenoles, especialmente, los flavonoides son los encargados de que la maca actúe como un antibacteriano, bactericida y citotóxico. Es importante mencionar que los flavonoides también son conocidos como catequinas. El té verde, camu camu y maca; tienen este componente en común, he ahí la explicación para la efectividad antibacteriana de estas tres plantas. Se define como efecto antibacteriano a la capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria por una sustancia. Existen estudios

previos en los cuales muestran este producto a beneficio de la salud como un estimulante del sistema nervioso central, antiestrés, antianímica, vitamínica, contra la fatiga, memoria y también a favor de la función reproductiva como vigorizante sexual; sin embargo, no existen estudios en el que se haya demostrado la eficacia del efecto antibacteriano del *Lepidium meyenii* frente a las bacterias *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus Sanguinis* (ATCC 10556).⁽¹⁹⁻²⁴⁾

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* en sus tres ecotipos (maca roja, amarilla y negra) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio

El diseño es de tipo experimental *in vitro*.

Población/Muestra

La unidad de análisis de este estudio está conformada pocillos embebecidos del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* en sus tres ecotipos (amarilla, roja y negra) colocados en 7 placas petri que contenían cepas de cultivos, obtenidas de comercialmente del Laboratorio Genlab del Perú S.A.C. Además, los extractos fueron sometidos a células de mamífero, correspondiente a la línea celular MDCK (*Mardin-Darby Canine Kidney cells*) contenidas en placas de cultivo.

Para cada una de las placas se realizaron 11 repeticiones y se añadió Clorhexidina al 0.12%. Posteriormente, se evaluó el efecto antibacteriano empleándose la técnica de difusión en pozo.

El tamaño muestral se obtuvo mediante la fórmula estadística de estimación de medias, haciendo uso de los datos que se obtuvieron de la prueba piloto en el software Stata ® versión 12.0.

El tamaño y tipo muestral se realizó por conveniencia.

Para el desarrollo de los experimentos, se formaron los grupos de la siguiente manera:

GRUPO 1: Pocillos con línea celular MDCK cultivada en medio DMEM, los cuales fueron incubados con el extracto *Lepidium meyenii* (maca amarilla) a concentraciones o diluciones diferentes.

GRUPO 2: Pocillos con línea celular MDCK cultivada en medio DMEM, los cuales fueron incubados con el extracto *Lepidium meyenii* (maca roja) a concentraciones o diluciones diferentes.

GRUPO 3: Pocillos con línea celular MDCK cultivada en medio DMEM, los cuales fueron incubados con el extracto *Lepidium meyenii* (maca negra) a concentraciones o diluciones diferentes.

GRUPO 4: Pocillos con línea celular MDCK cultivada en medio DMEM, sobre los cuales no se acondicionó ningún extracto; el volumen fue enrasado solo con medio de cultivo DMEM (control negativo).

GRUPO 5: Extracto metanólico de *Lepidium meyenii* (maca amarilla) sobre cultivos de *Streptococcus mutans* durante 48 horas.

GRUPO 6: Extracto metanólico de *Lepidium meyenii* (maca roja) sobre cultivos de *Streptococcus mutans* durante 48 horas.

GRUPO 7: Extracto metanólico de *Lepidium meyenii* (maca negra) sobre cultivos de *Streptococcus mutans* durante 48 horas.

GRUPO 8: Extracto metanólico *Lepidium meyenii* (maca amarilla) sobre cultivos de *Streptococcus sanguinis* durante 48 horas.

GRUPO 9: Extracto metanólico *Lepidium Meyenii* (maca roja) sobre cultivos de *Streptococcus sanguinis* durante 48 horas.

GRUPO 10: Extracto metanólico *Lepidium Meyenii* (maca negra) sobre cultivos de *Streptococcus sanguinis* durante 48 horas.

GRUPO 11: Clorhexidina al 0.12% (grupo control).

Técnicas y procedimientos

Solicitud de permisos

Se solicitó permiso al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas y al Instituto de Investigación Nutricional (IIN) para poder acceder a los laboratorios y así, realizar la ejecución del proyecto.

Capacitación

Se capacitó a las investigadoras en métodos bioquímicos y microbiológicos. Posteriormente, fueron calibradas con la asesora especialista en ambas técnicas.

Obtención del recurso natural

El tubérculo de *Lepidium meyenii* (Maca en sus 3 ecotipos: amarilla, roja y negra) fue obtenida de un productor del departamento de Cerro de Pasco-Provincia de Pasco.

Se obtuvo 1/2 kg. de tubérculos de cada uno de los tres ecotipos (roja, amarilla y negra). La materia prima fue liberada de cualquier desecho (astillas, extremidades o restos de tierra, entre otros).

Para la elaboración de este proyecto, se trabajó directamente con el tubérculo que se usa para consumo humano. Para el extracto se utilizó como solvente Metanol, lo que permitió obtener extracto metanólico de *Lepidium meyenii*.

Obtención de las cepas bacterianas

Para este estudio se utilizó dos cepas bacterianas, *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), las cuales se adquirieron del laboratorio GenLab S.A.C. para el desarrollo del estudio.

Estas cepas fueron cultivadas y procesadas por las investigadoras bajo la supervisión de la asesora especialista siguiendo las instrucciones brindadas por el fabricante en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas- Instituto de Investigación Nutricional.

Preparación del extracto metanólico

Se procedió a seleccionar los tubérculos y se pulverizó la materia prima (cada ecotipo de maca).

Para la elaboración de los extractos, se pesaron 250 g de cada ecotipo de *Lepidium Meyenii* (roja, amarilla y negra) y se colocó la maca pulverizada en una botella de vidrio estéril (cada ecotipo de manera independiente). Luego, se adicionó metanol puro (Merck® peruana) en

una proporción 1:2 (P/V). Los frascos conteniendo el macerado fueron cubiertos de la luz con ayuda de papel platino e incubadas a temperatura ambiente durante 10 días, con ligeros movimientos cada 12 horas.

Posteriormente, el preparado fue filtrado con una membrana estéril de papel Whatman N° 4 y el sobrenadante, recolectado en tubos de 50 ml estériles para su posterior evaporación en el rotavapor a 55°C por un lapso de 12 horas, con el objetivo de que se pueda volatilizar el metanol residual. Las preparaciones finales se conservaron a 4°C hasta su uso.

Evaluación de efecto antibacteriano (Difusión en agar)

Como lo describieron Álvarez y col., para la evaluación de la actividad antibacteriana se realizó el método de difusión en pozo o también denominada perforación en gel de agar.⁽¹³⁾ Se emplearon placas de agar con medio *Brain Heart Infusion* (BHI) inficionadas con 0.5 ml de cada uno de los microorganismos. Teniendo como ayuda un sacabocados, en cada una de las placas se hicieron 5 orificios que tenían un diámetro de 8 mm cada uno; y a cada pocillo, se le añadió 100µl de cada uno de los extractos metanólicos previamente preparados.

Como control positivo, para este estudio se empleó 100µl de Clorhexidina al 0.12% y como control negativo solución tamponada fosfato (PBS 1X). Los experimentos se realizaron por triplicado en tres tiempos diferentes. Es importante mencionar que todos los pasos fueron realizados dentro de una cabina de flujo laminar tipo II para conservar las condiciones de esterilidad. Luego, las placas se incubaron a 37°C por un lapso de 48 horas en condiciones de anaerobiosis controlada. Luego de este tiempo, fueron realizadas las mediciones de los halos de inhibición (diámetro - mm).

Aquellos extractos donde se encontró u observó actividad antibacteriana fueron estudiados a mayor profundidad a través del método de microdilución.

Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (Prueba de microdilución)

La determinación de la concentración mínima inhibitoria de cada extracto fue realizada siguiendo las recomendaciones del Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2012).

Se prepararon diluciones seriadas (entre 0-100µg/ml) de cada uno de los extractos metanólicos de maca en solución tamponada fosfato (PBS 1X).

Para el ensayo se emplearon placas de agar con medio *Brain Heart Infusion* (BHI) inficionadas con 0.5 ml de cada uno de los microorganismos a evaluar. Posteriormente, teniendo como ayuda un sacabocados se hicieron 5 orificios que tenían 8 mm de diámetro en cada placa; y a cada pocillo, se le agregó 100µl de las diluciones de los extractos previamente preparadas.

Como control positivo se utilizó 100µl de Clorhexidina al 0.12% y diluciones seriadas de este producto en PBS 1X. Como control negativo se utilizó solución tamponada fosfato (PBS 1X). Los experimentos se realizaron por triplicado en tres tiempos diferentes. Las placas fueron ingresadas a la incubadora a 37°C por un lapso de 48 horas en condiciones de anaerobiosis controlada.

Se registró como CMI a la menor concentración en la que pudo observarse crecimiento bacteriano.

Evaluación del efecto bactericida

Este método permite determinar la viabilidad de las bacterias *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) frente a los extractos analizados. El efecto bactericida se refiere al agente o solución que disminuye en 99.9% el crecimiento de las bacterias a partir de un inóculo de subcultivo puro.

Se realizaron diluciones seriadas de los extractos metanólicos evaluados (las diluciones seriadas se realizaron en PBS 1X). Posteriormente, a cada dilución se le inoculó 5 µl de la suspensión de cada una de las bacterias evaluadas. El control positivo empleado fue 5 µl de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) en presencia de BHI. Las muestras fueron ingresadas a la incubadora para mantener las condiciones de anaerobiosis (37°C) por un lapso de 24 horas.

Posteriormente, transcurrido el tiempo, se procedió a sembrar 100 µL de la muestra incubada en placas de BHI agar. Las muestras se incubaron manteniendo las mismas condiciones (anaerobiosis controlada a 37°C) por un lapso de tiempo de 72 horas (tiempo máximo en que se observa crecimiento del cultivo control). Los experimentos se realizaron por triplicado en

tres tiempos diferentes. El crecimiento bacteriano fue evaluado mediante la presencia o ausencia de unidades formadoras de colonias (UFC).

Línea celular

La línea celular MDCK se obtuvo de la ATCC (Colección americana de cultivos, USA). Las células se cultivaron en un medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Grand Island, Nueva York), suplementado con suero bovino fetal al 10% (SFB), 25 µg/L de gentamicina y 200 mM L-glutamina. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ en condiciones de esterilidad.

Evaluación de la citotoxicidad (Prueba MTT)

La CC₅₀, es definida como la concentración que tiene una sustancia para lograr reducir la viabilidad de las células a un 50% y se determina haciendo uso de la prueba de MTT.

La citotoxicidad del extracto metanólico de *Lepidium meyenii* (maca) se evaluó haciendo uso de una prueba colorimétrica, la cual está basada en la reducción de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) a causa de las enzimas mitocondriales.⁽¹⁴⁻¹⁷⁾ Las pruebas se realizaron en una microplaca estéril empleada para el cultivo celular, ésta tenía 96 pocillos.

Cada uno de los pocillos pudo cultivar 1×10^4 células/pocillo en 200 µL de medio (8 mm de diámetro; *Falcon Plastics*, Oxnard, CA). Las muestras se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂ por un lapso de 24 horas. Posteriormente, al monocapa celular se le añadió el extracto de *Lepidium meyenii* (maca) a distintas concentraciones, éstas se encontraban dentro del rango de 10 a 800 µg/mL.

Como control positivo de viabilidad celular se usó el medio de cultivo, cabe recalcar que éste no contenía extracto alguno. El cultivo se incubó a 37°C por un lapso de 6 días. La morfología de las células tuvo que ser supervisada a diario; y, visualizada al microscopio para verificar y a su vez, detectar alguna variación.

Posteriormente, se le añadió 20µL de solución de MTT (3 mg/mL en PBS 1X) a cada pocillo y las muestras se incubaron por un lapso de 3 horas a 37 °C. Este medio tuvo que ser removido

con mucho cuidado para evitar levantar cristales de formazán, los cuales se diluyeron con 200 μ L DMSO (Dimetil Sulfoxido). La viabilidad celular fue cuantificada un lector de ELISA (Biorad) a una densidad óptica de 570 nm.

Para finalizar, la viabilidad celular se calculó como el porcentaje de la absorbancia que se obtuvo en cada uno de los pocillos versus las células que no se vieron afectadas o que no pudieron ser tratadas. La CC50 fue determinada a través del Software de computador Pharm/PCS (Tallarida and Murray, 1987). Se evidenció la variación morfológica a través de la evaluación microscópica de monocapas, para así, poder confirmar o realizar una comparación con los resultados que se obtuvieron en la prueba de MTT.

Recolección de datos

Los datos de disminución de UFC fueron registrados en una ficha numerada. Se realizó las fichas del efecto antibacteriano para cada ecotipo de maca (amarilla, roja y negra). Luego, se llevó a cabo la exposición de estas bacterias frente a cada uno de los extractos, midiendo la concentración mínima inhibitoria y efecto bactericida. De esta manera, se verificó si las unidades formadoras de colonia (UFC) disminuían o se inhibían por completo. Para ello, el tipo de mediciones que se empleó fue μ g/ml y disminución de UFC.

Plan de análisis

Para el análisis univariado, se procedió a realizar la estadística descriptiva, en la cual se calcularon las medidas de tendencia central (media, mediana) y medidas de dispersión (desviación estándar, rango intercuartílico) de las variables en estudio.

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de ética en Investigación (CEI) de la Universidad Peruana de ciencias Aplicadas (carta N°PI 017-19). La ejecución fue realizada en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC)- Instituto de Investigación Nutricional (IIN). (Anexo 1)

3 RESULTADOS

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar el efecto antibacteriano del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* (maca) en sus tres ecotipos (roja, negra, amarilla) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Los resultados obtenidos demostraron que para el efecto antibacteriano, la maca roja presentó valores más altos sobre el microorganismo *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y la maca negra frente al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), a diferencia de la maca amarilla, la cual tuvo valores menores frente a ambos microorganismos.

En la tabla 1, se puede observar la evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano del extracto metanólico *Lepidium meyenii* (maca) en sus tres ecotipos (roja, negra, amarilla) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Para la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) se encontró que la maca roja obtuvo una media (+- d.e) de 13.5 ± 0.60 mm, para el caso de la maca negra fue de 13.3 ± 0.53 mm. y la maca amarilla 12 ± 0.27 mm respectivamente. Mientras que para el grupo control, la clorhexidina al 0.12% mostró un halo de inhibición de 25.8 ± 0.29 mm. Por otro lado, para el *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), se encontró que la media (+- d.e) de la maca roja fue 17.6 ± 0.23 mm., para la maca negra fue 19.6 ± 0.44 mm y la maca amarilla 14.8 ± 0.26 mm. Mientras que el grupo control, la clorhexidina al 0.12% tuvo una media (+- d.e) de 24.5 ± 0.50 mm (Tabla 1 y gráfico 1).

En la tabla 2, se observa la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (MBC) de los tres ecotipos de maca sobre las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Para el caso del *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) se observó que la MIC fue de 125.0µg/ml y MBC de 62.5 µg/ml tanto para la maca roja como para la maca negra. Sin embargo, para la maca amarilla el MIC fue 250.0 µg/ml y MBC de 125.0 µg/ml respectivamente. Mientras que, para el *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) se observó que para la maca roja y negra fue, MIC de 62.5µg/ml y MBC de 31.3 µg/ml, sin embargo, la maca amarilla tuvo un MIC de 31.3 µg/ml y 15.6 µg/ml respectivamente (Tabla 2 y gráfico 2).

El gráfico 3 muestra la concentración citotóxica de los tres ecotipos de maca sobre las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Para el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), la maca roja presenta una disminución de la viabilidad celular al 50% (CC50) a una concentración de 500 µg/ml; la maca negra, 750 µg/ml y la maca amarilla, 900 µg/ml. Para el caso del *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) la maca roja presenta una disminución de la viabilidad celular al 50% a una concentración de 610 µg/ml; la maca negra, 710 µg/ml y la maca amarilla, 920 µg/ml.

Tabla 1

Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* (maca) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)

Microorganismo	Grupo	Media (mm)	Mediana (mm)	D.E.	Min (mm)	Max (mm)
<i>Streptococcus mutans</i>	Maca Roja	13.5	13.25	0.60	13	14.5
	Maca Negra	13.3	13.5	0.53	12.5	14
	Maca Amarilla	12.0	12.0	0.27	11.5	12.5
	Chx 0.12%	25.8	26.0	0.29	25.5	26.0
<i>Streptococcus Sanguinis</i>	Maca Roja	17.6	17.5	0.23	17.5	18.0
	Maca Negra	19.6	19.8	0.44	19.0	20.0
	Maca Amarilla	14.8	15	0.26	14.5	15.0
	CHX 0.12%	24.5	24.5	0.50	24.0	25.0

*Prueba de Shapiro Wilk

Figura 1

Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* (maca) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)

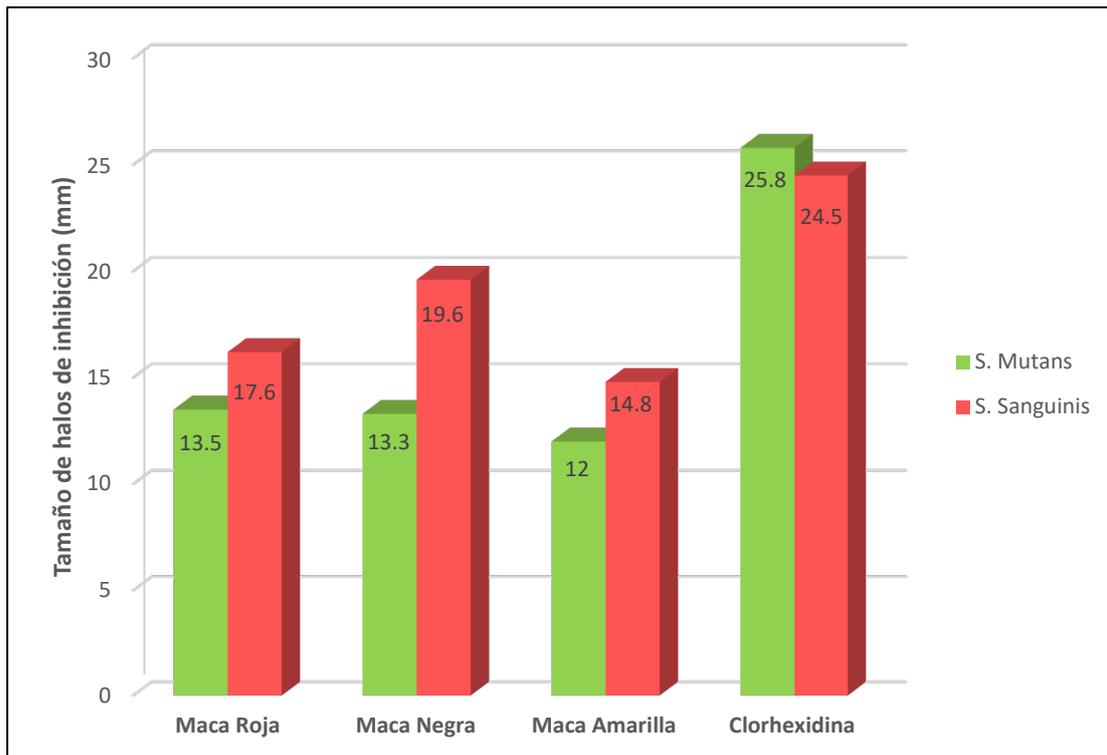


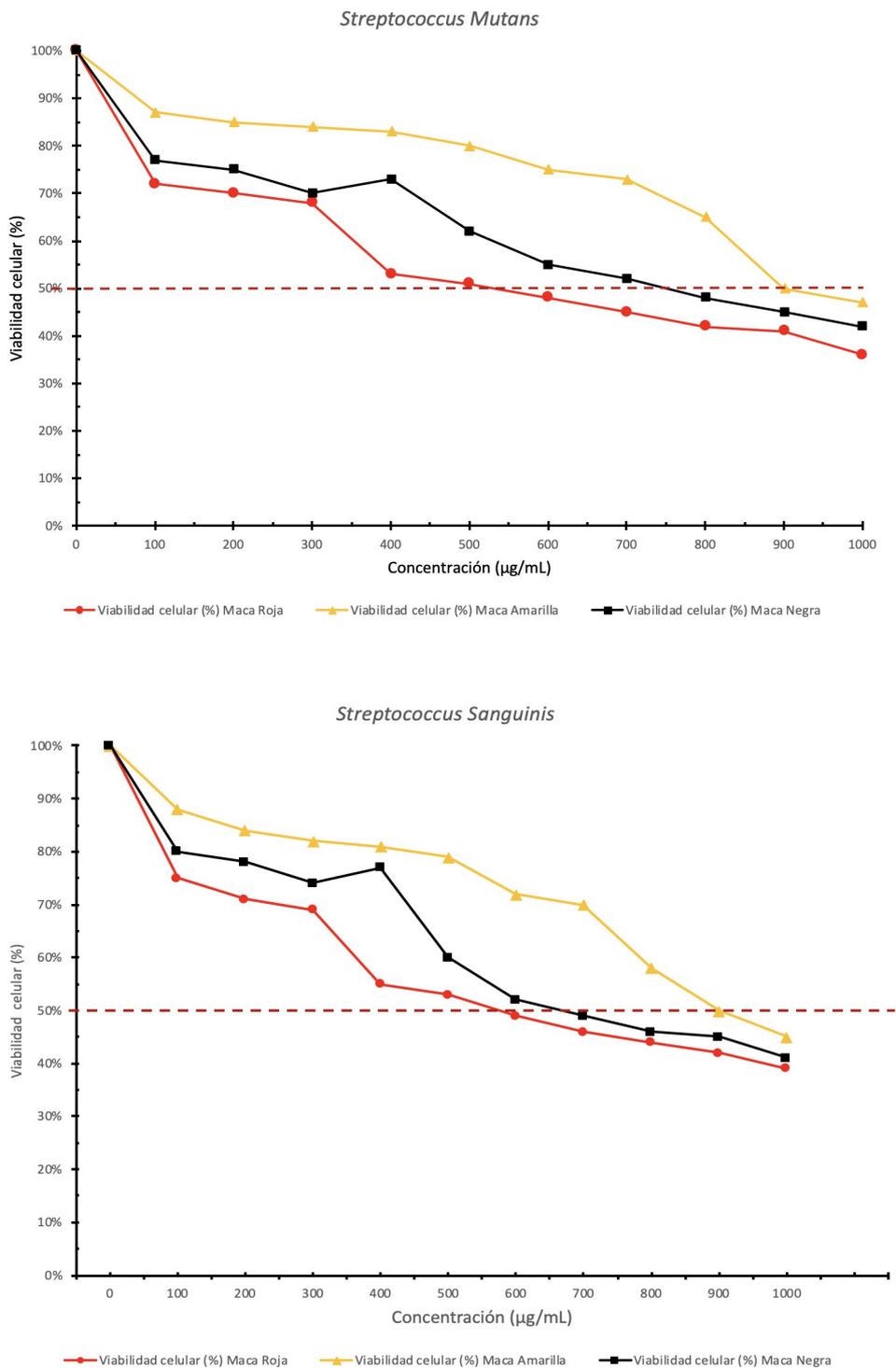
Tabla 2

Evaluación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* (maca) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)

Microorganismo	Grupo	Concentración (µg/ml)						
		500	250.0	125.0	62.5	31.3	15.6	7.8
<i>S. Mutans</i>	Maca Roja	-	-	MIC	MBC	-	-	-
	Maca Negra	-	-	MIC	MBC	-	-	-
	Maca Amarilla	-	MIC	MBC	-	-	-	-
<i>S. Sanguinis</i>	Maca Roja	-	-	-	MIC	MBC	-	-
	Maca Negra	-	-	-	MIC	MBC	-	-
	Maca Amarilla	-	-	MIC	MBC	-	-	-

Gráfico 3

Evaluación del efecto citotóxico del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* (maca) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)



4 DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue observar los valores obtenidos al evaluar el efecto antibacteriano, bactericida del *Lepidium meyenii* en presencia de las bacterias *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), así como la evaluación del efecto citotóxico de los tres ecotipos de *Lepidium meyenii* frente a la línea celular MDCK. Los resultados obtenidos demostraron que para el efecto antibacteriano, la maca roja tiene valores más altos sobre las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y la maca negra frente al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

La metodología de este estudio para la evaluación del efecto antibacteriano estuvo basada en el uso del método de difusión en disco o en pozo, descrito por Bauer et al (método de Kirby-Bauer) en el año 1997⁽²⁸⁾, así como Jalayer y col en el año 2007.⁽²⁷⁾ La técnica en papel tiene muchas desventajas, ya que se utiliza un papel filtro Whatman y este tiene una superficie hidrofílica que impide la difusión en el agar. A diferencia del método de difusión en pozo, en el cual el extracto contacta en forma directa con el agar, por eso se considera que esta técnica tiene mayor sensibilidad. Un estudio realizado por Cruz-Carillo y col., comparó las dos metodologías pero con diferentes extractos y se pudo evidenciar que en la prueba de difusión en pozo los extractos obtuvieron un mejor resultado.⁽³³⁾ Por esta razón, en este estudio se optó por utilizar el método de difusión en pozo, el cual consiste en el vínculo o nexo que existe entre la concentración de una sustancia utilizada para inhibir una cepa bacteriana y el crecimiento del halo de inhibición sobre la superficie de la placa agar, la cual contiene un medio de cultivo apropiado. Éste es sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre ella, se siembra un pozo impregnado con una cantidad de la sustancia conocida.

Adicionalmente, se utilizó la prueba de microdilución en caldo a modo de prueba de susceptibilidad microbiana para poder obtener la concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC). En el caso de este estudio, se empleó como caldo el BHI (Brain Heart Infusion), el cual es utilizado para el cultivo de diferentes microorganismos que pueden o no ser patógenos, incluyendo bacterias aerobias o anaerobias.

Romero y col. en el año 2009 utilizaron una metodología similar, pero con aceite esencial de *Matricaria recutita* (manzanilla) sobre las cepas de *Streptococcus mutans* en presencia del BHI. ⁽³¹⁾ Los resultados de este estudio demostraron que esta técnica es de confiabilidad para este tipo de procedimientos. Por este motivo, para el desarrollo de este estudio se decidió emplear la misma metodología en presencia del BHI descrita por estos autores.

Actualmente, en la farmacología y la medicina fitoterapéutica, uno de los puntos de mayor relevancia es la evaluación de la citotoxicidad en los compuestos naturales, para lo cual, en este estudio se realizó la prueba de MTT. Existen diferentes técnicas para poder determinar la citotoxicidad; sin embargo, los más utilizados son: El ensayo de capacitación del rojo neutro y la prueba de MTT (bromuro de 3 (4,5 dimetil 2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) que se encarga de inhibir la actividad mitocondrial. ⁽³²⁾ En este caso se empleó la prueba de MTT, ya que, es un método efectivo que determina la viabilidad celular y una de sus ventajas es que es cuantitativo, a comparación del resto de métodos colorimétricos que se caracterizan por ser cualitativos. El estudio realizado por Takeuchi y col. en el año 1991 hizo uso de esta técnica para determinar la viabilidad celular de las células que ya se encontraban infectadas por el virus del herpes simple y se pudo apreciar que el método tiene mayor sensibilidad y simplifica los diferentes procedimientos, permitiendo así evaluar una mayor cantidad de compuestos ⁽²³⁾. Son las razones previamente mencionadas las que impulsaron a utilizar la prueba de MTT en este estudio.

Existen algunos estudios enfocados a la evaluación de las diferentes propiedades terapéuticas del *Lepidium meyenii* ^(11,12) y dos estudios relacionados al efecto citotóxico de esta planta. Uno de ellos es de Alzamora del año 2007, en el que se evalúa tres ecotipos de maca (amarilla, morada y negra) ⁽²⁶⁾; y el otro, de Canales et al. Del año 2000, en el que se utilizó ensayos de viabilidad y colorantes vitales. ⁽³⁰⁾ En ambos casos los cultivos presentaban muy buena tolerancia al extracto acuoso de *L. meyenii*. Esto indicaría que la citotoxicidad del extracto de *Lepidium meyenii* en este estudio podría estar relacionada con los metabolitos secundarios: alcaloides, polifenoles, antocianinas y flavonoides. Asimismo, Hou XR et al en el año 2004 ⁽²⁹⁾, mencionan que el alcaloide fue presentado anteriormente como un componente de la maca que tenía acción antibacteriana. Teniendo en cuenta los artículos previamente

mencionados que reafirman la hipótesis de que la *Lepidium meyenii* tiene efecto antibacteriano, este estudio propuso evaluar la actividad antibacteriana de los tres ecotipos de maca de mayor consumo en nuestro país frente a bacterias orales.

Los microorganismos presentes con mayor frecuencia en la cavidad oral son *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus mutans*. Por un lado, el *Streptococcus mutans* es una bacteria Gram positiva que se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental. Asimismo, se caracteriza por ser una bacteria anaerobia facultativa, la cual puede continuar su crecimiento cuando el medio donde se encuentra es ácido; y de esta manera, continuar degradando los carbohidratos, causando erosión al esmalte dental. Por otro lado, el *Streptococcus sanguinis* es una variedad del *S. Viridans*, el cual se encuentra normalmente en la placa dental. La presente investigación decidió evaluar ambos microorganismos por encontrarse en mayor porcentaje en la cavidad oral y por las repercusiones antes mencionadas.

Los resultados del estudio demostraron que para el efecto antibacteriano, la maca roja tiene valores más altos sobre el microorganismo *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y la maca negra frente al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), a diferencia de la maca amarilla, la cual tuvo menores valores frente a ambas cepas bacterianas. Asimismo, es importante mencionar que las propiedades antibacterianas han sido corroboradas por Tellez en el año 2002. ⁽²⁵⁾ Este autor mencionó que la efectividad se debe a que la maca dentro de su composición tiene: alcaloides, aminoácidos, sales minerales, esteroides, saponinas, riboflavina, flavonoides, etc. Haciendo una comparación del actual estudio con el de Tellez, se puede atribuir que existen valores más altos de la propiedad antibacteriana de las macas roja y negra debido a la presencia de una mayor cantidad o un mayor porcentaje de polifenoles en su composición, especialmente las catequinas (flavonoides). Esto se debe a que las catequinas por tener carácter antibiótico van a provocar lisis bacteriana, especialmente cuando actúan frente a bacterias gram+ anaerobias facultativas que pertenecen al género *Streptococcus*.

Otro de los hallazgos fue la concentración mínima inhibitoria (MIC) encontrada para la maca roja y negra frente al *Streptococcus mutans*, la cual fue 125 µg/ml; mientras que, para la amarilla fue de 250 µg/ml. Esto probaría que tanto la maca roja como la negra necesitan una menor concentración para inhibir el crecimiento del microorganismo *Streptococcus mutans*, a diferencia de la maca amarilla que necesita una mayor concentración para inhibir esta misma bacteria. Frente al *Streptococcus sanguinis*, se pudo apreciar que se necesita de una concentración de 62.5 µg/ml de maca roja y negra para poder inhibir el crecimiento esta bacteria; mientras que, se requiere una concentración de 31.3 µg/ml para inhibir el mismo microorganismo. La razón de que la maca roja y negra hayan tenido un mejor efecto frente a las bacterias *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*; y, requieran de una menor concentración para inhibir ambos microorganismos, se debe a que éstas tienen mayor cantidad de flavonoides en su composición, a diferencia de la maca amarilla, la cual si tiene presencia de flavonoides, lo cual explica su efecto antibacteriano, pero en menor cantidad, por ello, requiere de una mayor concentración para su efectividad .

Otro de los efectos evaluados fue la concentración mínima bactericida. Esta se define como la concentración menor que previene el crecimiento de una bacteria u organismo después de haber sido cultivado en un medio que debe estar libre del compuesto evaluado. Por un lado, los resultados encontrados mostraron que la maca roja y negra son las mejores opciones para prevenir el crecimiento bacteriano del *Streptococcus mutans*, ya que una concentración de 62.5 µg/ml sería suficiente para lograr este efecto; mientras que, para la maca amarilla se requiere de una concentración de 125 µg/ml. Por otro lado, para prevenir el crecimiento del *Streptococcus sanguinis*, la mejor opción sería la maca amarilla, ya que solo requiere de una concentración de 15.6 µg/ml para la prevención del crecimiento bacteriano sobre esta bacteria, a diferencia de las macas roja y negra que necesitan una mayor concentración de 31.3 µg/ml. La explicación para que las macas roja y negra hayan necesitado una menor concentración para prevenir el crecimiento bacteriano, se debe a que tienen alta cantidad de fluoruro, el cual se atribuye gracias a la presencia de taninos en su composición. Éstos son compuestos polifenólicos que tienen mayor afinidad por las proteínas, por lo tanto, beneficia la precipitación e inactivación de éstas cuando ocurre algún proceso inflamatorio y a su vez, son encargados de bloquear los procesos de colonización bacteriana.

Por último, se evaluó la concentración citotóxica para las diferentes macas. Este efecto cuantifica las mitocondrias, es decir las células que aún no han sido afectadas por el extracto. Para el caso de *Streptococcus mutans*, los resultados demostraron que la maca roja reduce la viabilidad celular al 50% a una concentración de 500 µg/ml, esto quiere decir que este ecotipo necesita una menor concentración para lograr alcanzar el mismo porcentaje de células no tratadas que necesitarían las macas amarilla y negra, pero con concentraciones mayores, de 750 µg/ml y 900 µg/ml respectivamente. Para el *Streptococcus sanguinis* sucedió exactamente lo mismo, ya que nuevamente se evidenció que la maca roja lograba el mismo efecto a una menor concentración de 610 µg/ml.

La limitación está relacionada a que es un estudio experimental generado dentro de un laboratorio con condiciones controladas.

Finalmente, la importancia de este estudio es que propone una mayor amplitud sobre el uso de las plantas para fines terapéuticos y el empleo que se les da en el campo de la Odontología. Por ello, se sugiere a futuros estudios en los que se evalúe plantas nativas sobre bacterias presentes en la cavidad oral, el uso o la creación de principios activos para generar productos odontológicos, y así tener otros recursos y/o alternativas de tratamientos con las que se puede contar para hacer frente a enfermedades que afecten a la salud oral.

Finalmente, esta investigación determinó que sí existe efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Lepidium meyenii* sobre los microorganismos más comunes y de mayor prevalencia en las enfermedades de la cavidad oral, como lo son las bacterias *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.

5 CONCLUSIONES

- El promedio del efecto antibacteriano de la maca roja fue de 13.5mm, de la maca negra 13.3 y la maca amarilla 12 mm sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Mientras que, frente al *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), la maca roja tuvo un efecto antibacteriano de 17.6mm; la maca negra, 19.6mm y la amarilla 14.8 mm.
- La concentración mínima inhibitoria (MIC) para la maca roja y negra fue de 125.0µg/ml; mientras que, para la maca amarilla fue de 250.0 µg/ml frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Frente a la bacteria *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), la CMI para la maca roja y negra fue de 62.5µg/ml y para la maca amarilla 31.3 µg/ml.
- La concentración mínima bactericida (MBC) para la maca roja y negra fue de 62.5 µg/ml; mientras que, para la maca amarilla fue de 125.0 µg/ml frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Frente a la bacteria *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), la CMI para la maca roja y negra fue de 31.3 µg/ml y para la maca amarilla 15.6 µg/ml.
- Existe efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Lepidium meyenii* sobre los microorganismos más comunes y de mayor prevalencia en las enfermedades de la cavidad oral, como lo son las bacterias *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kassebaum A, Smith E, Bernabe T, Fleming A, Reynolds T, et al. Oral Health Collaborators. J. Dent. Res. 2017; 96(4): 380–387.
2. Yadav K, Prakash S. Dental Caries: A Review. As. J. Bio. Pharl. Scien. 2016; 6(53): 01-07.
3. Toledo RL, Calcines FM, Ramos HI. Associated factors with the incidence of caries in the school population. Med. Elect. 2012;16(4): 248-255.
4. Herrera M, Bonilla V, Segura J. Caries enfermedad *versus* caries lesión: implicaciones diagnósticas y terapéuticas según el International Caries Consensus Collaboration Group. *Endodon.* 2016; 34(4):204-219.
5. Le P, Matamoros S, Montassier E, Le Vacon F, Potel G, Soueidan A, et al. The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract *Can. J. Microbiol.* 2017; 63: 475–492.
6. Serrano H, Sánchez M, Cardona N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Rev. CES Odont.* 2015; 28(2):1-5.
7. OMS. Manual de Fitoterapia. [Internet]. EsSalud. 2001 [citado 02/10/18].
8. Avello M, Cisernas I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Med. Chile* 2010; 138(10): 1288- 93.
9. Mejía J, Carrasco E, Miguel J, Flores S. Conocimiento, aceptación y uso de medicina tradicional peruana y de medicina alternativa/complementaria en usuarios de consulta externa en Lima Metropolitana. *Rev. Peru. Med. Int.* 2017; 2(1): 47-57.
10. Villar López M, Ballinas Sueldo Y, Soto Franco J, Medina tejada N. Conocimiento, aceptación y uso de la medicina tradicional, alternativa y/o complementaria por médicos del Seguro Social de Salud. *Rev. Peru. Med. Int.* 2016; 1(1): 13-8.
11. Gonzales GF, Villaorduña L, Gasco M, Rubio J, Gonzales C. Maca (*Lepidium meyenii* Walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica.* 2014; 31 (1): 100-10.
12. Sifuentes G, León S, Paucar L. Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp), cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scien. Agrop.* 2015; 6 (2): 131-140.
13. Álvarez M, Izzasa M, Echeverry H. Efecto antibacteriano *in vitro* *Austroecupatorium inulaefolium* HBK (salvia amarga) y *Ludwigia polygonoides* HBK (clavo de laguana). *Biosalud.* 2005; 14: 46-55.

14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65 (1-2): 55-63.
15. Cicero A, Bandieri E, Arletti R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J. Ethnopharmacol.* 2001; 75: 225-229.
16. Muhammad I, Zhao J, Dunbar D, Khan I. Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'. *Phytochem.* 2001; 59: 105-110.
17. Esparza E, Hadzich A, Cosio E. La maca: la química detrás de su secado tradicional. *Rev. Quím. PUCP.* 2015; 29(1): 11-13.
18. Wang Y, McNeil B, Harvey LM. Maca: An Andean crop with multi- pharmacological functions. *Food. Res. Intern.* 2007; 40: 783- 789.
19. Yusuke A, Akira T, Yuki N. Effect of *Lepidium meyenii* on *in vitro* fertilization via improvement in acrosome reaction and motility of mouse and human sperm. *Reprod Med Biol.* 2019; 18:57–64.
20. Zhong A, Ai-Fang C, Yun-Tao. Antidepressant-Like Behavioral, Anatomical, and Biochemical Effects of Petroleum Ether Extract from Maca (*Lepidium meyenii*) in Mice Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress. *J Med Food.* 2014 May 1; 17(5): 535-542.
21. Lin L, Huang J, Sun D. Maca (*Lepidium meyenii*) as a source of macamides and polysaccharide in combating of oxidative stress and damage in human erythrocytes. *International journal of food science & technology*, 53(2), 304-312.
22. Carmichael J, DeGraff W, Gazdar A, Minna J, Mitchell J. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 1987; 47: 943-46.
23. Takeuchi H, Baba M, Shigeta S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. *J. Virol. Meth.* 1991; 33 (1-2): 61-67.
24. Wyde P, Ambrose M, Meyerson L, Gilbert B. The antiviral activity of SP-303, a natural polyphenolic polymer, against respiratory syncytial and parainfluenza type 3 viruses in cotton rats. *Anti. Res.* 1993; 20 (2): 145-5.
25. Tellez M, Kahn I, Kobaisy M, Schrader K, Dayan F, Osbrink W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Scien. Dir.* 2002; 61(2): 160-162.

26. Alzamora L, Colona E, Acero N, Galán A, Muñoz D, Linares F et al. Efecto citotóxico del extracto metanólico de tres ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre líneas celulares HeLa y HT-29. Rev. peru biol. 2007; 13(3): 219-220.
27. Jalayer N, Niakan M, Kharazi M, Zardi S. Antibacterial Activity of Iranian Green and Black Tea on Streptococcus mutans: An in vitro Study. J Dent (Tehran). 2011; 8(2): 55-9
28. Ramírez L. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scien. Tech. 2009; 42: 263-265.
29. Hou X.R., Q. Chen, R.H. Cao, W.L. Peng, & A.L. Xu. A comparative molecular field analysis of cytotoxic beta carboline analogs. Acta Pharmacol. 2004; 25: 959-965.
30. Canales M., J. Aguilar, A. Prada, A. Marcelo, C. Huamán & L. Carvajal. Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* (MACA) en ratones albinos y su descendencia. Arch. Lat. Nutri. 2000; 50(2): 32-36.
31. Romero M, Hernández Y, Gil M. Actividad inhibitoria de la Matricaria recutita (Manzanilla alemana) sobre Streptococcus mutans. Rev Latinoam Ortod y Odontoped. 2009; 1: 1-13.
32. Lodish H, Berk A, Zipursky L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología Celular y Molecular. 4ta ed. Nueva York: Freeman and Company eds; 2002. p. 595.
33. Cruz-Carrillo A, Rodríguez N, Rodríguez C. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Rev. U.D.CA Act & Div. Cient 2010; 13 (2): 117-24.

ANEXO

Carta de aprobación de Ética

CEI/022-04-19

Chorrillos, 23 de abril de 2019

Alumnas:
Maricelo Alvitez Jurado
Verónica Lucia Cárdenas Cabanillas
Alumnas de la Carrera de Odontología
Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas
Presente.

PI017-19: Evaluación in Vitro del efecto antibacteriano del extracto metanólico del *Lepidium meyenii* (maca) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Estimadas investigadoras:

Hemos recibido el protocolo de investigación y los documentos de soporte, los cuales han sido revisados en detalle. Luego de esta revisión, se concluye que esta investigación queda EXONERADA (EXENTA) DE REVISIÓN adicional por parte del Comité de Ética e Investigación (CEI) de la Facultad de Ciencias de la Salud y pueden proceder con su ejecución. La determinación de esta categorización se basa en lo establecido en el reglamento del Comité.

Las investigadoras deben de informar al Comité sobre cualquier cambio en el protocolo posterior a este dictamen. Del mismo modo, ante la aparición de cualquier evento o efecto -previsible o no- que comprometa la integridad y bienestar de las unidades de estudio, a las investigadoras o a su equipo de investigación durante el curso de la implementación, estos deben de ser también informados inmediatamente a este comité. El comité se reserva el derecho de supervisar de manera inopinada la progresión de la investigación en cualquier momento y bajo cualquier modalidad. Nos permitimos recordar a las investigadoras que la ejecución de un proyecto de investigación que contemple aspectos no meritorios de la categorización de "exenta de revisión" es una grave falta la cual puede ser sancionada con el cierre definitivo del estudio e imposibilidad de utilizar cualquier dato recolectado o generado en el mismo.

Sin otro particular, quedo de ustedes.



Dr. Rodrigo Rondón Herz
Presidente del Comité de Ética
Facultad de ciencias de la Salud



25 AÑOS
UPC
exígete, innova.

UPC

Universidad
Peruana de
Ciencias Aplicadas

Avenida Alameda
San Marcos
cuadra 2
Chorrillos
Lima 9 -
Perú T 511
313 3333
www.upc.edu.pe