



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Candida albicans* ATCC

10231

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**Cirujano Dentista**

**AUTORAS:**

León Vélez, Noelia Samantha (ORCID: 0000-0002-2905-8957)

Ñiquen Cornejo, Nikol Geraldine (ORCID: 0000-0002-4044-8841)

**ASESOR:**

Dr. Ruiz Barrueto, Miguel Angel (ORCID: 0000-0002-3373-4671)

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

Enfermedades infecciosas y transmisibles

PIURA – PERÚ

2021

## **Dedicatoria**

Al amor de mis amores, mi hijo. Al gran amor de mi vida, mi compañero, que siempre creyó en mí y me impulsó a estudiar esta carrera. A mi ángel, mi gran amiga Grace, quien me repitió una y mil veces ¡Nunca dudes de ti!

**Noelia León Vélez**

A mi primer amor y el hombre de mi vida, mi padre quien creyó en mis fortalezas y estuvo siempre ahí conmigo. A mí, por la valentía, paciencia, firmeza y perseverancia. A mi ángel, Grace quien me enseñó lo maravilloso de una amistad pura y sincera.

**Nikol Ñiquen Cornejo**

## **Agradecimientos**

Doy gracias a Dios por haberme permitido junto con mi familia llevar a cabo este sueño y proyecto

A mi compañero de vida por su apoyo incondicional y por creer en mi capacidad, aunque a veces pasamos momentos difíciles.

A mi familia y amigos, por su ayuda durante todo el tiempo de mi carrera, ya que aportaron a mis ganas de seguir adelante en la universidad

A mi asesor por su enseñanza, dedicación y perseverancia para inculcarnos sus conocimientos y guiarnos para lograr con su apoyo las metas propuestas.

**Noelia Samantha León Vélez**

Doy gracias a Dios por haberme dado la capacidad, sabiduría, inteligencia, paciencia y la oportunidad de culminar mis estudios.

A mis padres por ser el apoyo emocional, financiero en mi carrera que aun estando lejos los llevo en mi corazón y mente.

Agradezco a la universidad Cesar Vallejo por haberme acogido y brindado una educación de excelencia, formando mi vida en el ámbito profesional y personal.

A mi asesor el Dr. Miguel Angel Ruiz Barrueto por el esfuerzo, dedicación, paciencia y esmero, el cual con sus conocimientos y experiencias a logrado que pueda culminar mi tesis.

**Nikol Geraldine Ñiquen Cornejo**

## Índice de contenidos

Dedicatoria .....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de contenidos .....	iv
Índice de tablas .....	v
Resumen.....	vi
Abstract.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. METODOLOGÍA.....	15
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	15
3.2. Variables y operacionalización .....	15
3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis.....	15
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	16
3.5. Procedimientos.....	16
3.6. Método de análisis de datos .....	18
3.7. Aspectos éticos.....	18
IV. RESULTADOS .....	19
V. DISCUSIÓN.....	24
VI. CONCLUSIONES.....	28
VII. RECOMENDACIONES .....	29
REFERENCIAS.....	30
ANEXO .....	35
ANEXO 1 .....	35
ANEXO 2 .....	36
ANEXO 3 .....	37
ANEXO 4 .....	38

## Índice de tablas

Tabla 1.....	19
Tabla 2.....	20
Tabla 3.....	21
Tabla 4.....	22
Tabla 5.....	23

## Resumen

El presente estudio tuvo como objetivo comparar el efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Candida albicans* ATCC 10231. Fue una investigación básica con diseño experimental verdadero. Se evaluó el efecto *in vitro* de dos concentraciones de los probióticos *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus casei* ATCC 393. El control positivo Nistatina 100000 UI/mL. El efecto inhibitorio se determinó por el método de discodifusión. Los resultados revelaron que el efecto inhibitorio antifúngico de las dos concentraciones de los cuatro probióticos evaluados fue de tipo bacteriostático. La media e los halos de inhibición fluctuó en el rango de 6,55 mm y 7,86 mm. El control positivo expresó efecto inhibitorio antifúngico de tipo fungicida con un halo de inhibición promedio de 14,06 mm. Ningún ensayo probiótico superó el efecto del control positivo. Se concluye que todos los probióticos mostraron efecto inhibitorio sobre *Candida albicans* ATCC 10231 de tipo fungistático mientras que la Nistatina 100000 UI/mL mostró efecto de tipo fungicida.

**Palabras claves:** *Candida albicans*, Probióticos, Antifúngicos, Antibiosis.

## **Abstract**

The present study aimed to compare the in vitro effect of probiotic strains against *Candida albicans* ATCC 10231. It was a basic investigation with true experimental design. The in vitro effect of two concentrations of the probiotics *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus casei* ATCC 393. The positive control Nystatin 100000 IU / mL. The inhibitory effect was determined by the discodiffusion method. The results revealed that the antifungal inhibitory effect of the two concentrations of the four probiotics evaluated was bacteriostatic. The mean of the inhibition halos fluctuated in the range of 6.55 mm and 7.86 mm. The positive control expressed a fungicidal antifungal inhibitory effect with an average inhibition halo of 14.06 mm. No probiotic trials outperformed the positive control. It is concluded that all probiotics showed an inhibitory effect on *Candida albicans* ATCC 10231 of a fungistatic type, while Nystatin 100,000 IU / mL showed a fungicidal effect.

**Keywords:** *Candida albicans*, Probiotics, Antifungals, Antibiosis.

## I. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral se caracteriza por poseer diversa y heterogénea cantidad de microorganismos. La microbiota se organiza en una biopelícula que recubre las diversas estructuras del aparato bucal, originando que cada célula del ecosistema oral establezca una relación que regule su expresión génica y supervivencia. En condiciones normales, el equilibrio se mantiene entre la microbiota patógena y benéfica y la inmunidad del individuo.<sup>1</sup> La candidiasis oral es una infección fúngica considerada la enfermedad más común de la mucosa oral y es causado principalmente por *Candida albicans*. Su tasa de detección en la población general es de 20 a 75%. También se ha informado que la padecen un 15 a 71% los portadores de dentaduras postizas y un 80 a 95% los infectados con VIH.<sup>2</sup>

Los factores que afectan el estado de portador de *Candida albicans* son la edad, el sexo, xerostomía, el uso de prótesis mucosoportadas, el tabaco, el estado de salud, fundamentalmente alteraciones inmunológicas o endocrinas, determinados tratamientos farmacológicos.<sup>3</sup> En estudios anteriores con aislamientos de *Candida albicans* en pacientes con VIH positivo se indican importantes tasas de resistencia al fluconazol, Este aumento de la resistencia a los agentes antimicóticos utilizados ha dado lugar al desarrollo de investigaciones en busca de métodos alternativos para el tratamiento de *Candida albicans*, como la terapia fotodinámica, la sinergia de drogas, recursos naturales como la utilización de productos de plantas medicinales y el uso de bacterias probióticas<sup>4</sup>.

Los estudios in vitro con probióticos han demostrado reducción en la virulencia de *Candida* al inhibir la formación de biopelículas y beneficiando adicionalmente a los antifúngicos.<sup>5</sup> En odontología, los probióticos se utilizaron por primera vez para la prevención de la caries, la gingivitis y las afecciones periodontales. Sin embargo, a la fecha, los efectos de los probióticos para prevenir la candidiasis oral en la población no son claros.<sup>6</sup> Zurita<sup>7</sup> menciona que las infecciones fúngicas han incrementado en frecuencia e importancia en las últimas décadas, acompañadas de una alta mortalidad asociada a fungemia debido a *Candida*, en un 20 a 50 % de los casos, por *Aspergillus* en un 40 a 80 % y por algunos hongos emergentes. La mortalidad por estas infecciones puede ir más allá de 90%.



En Perú se reportó que en hospitales de Lima y Callao informó la especie de *Candida albicans* representó el 27,8 % de prevalencia entre otras infecciones micóticas. Los factores asociados a esta prevalencia fueron el huésped, la etiología de la enfermedad, el microorganismo y la resistencia o sensibilidad al antifúngico. Las poblaciones susceptibles de infecciones fúngicas oportunistas se han ido incrementando, debido a los avances médicos que han permitido mejorar el pronóstico de muchas enfermedades, y por la aparición del VIH/SIDA, constituyéndose en uno de los principales grupos de riesgo para adquirir una micosis.<sup>7</sup> La realidad problemática descrita anteriormente se genera el siguiente cuestionamiento ¿Cuál es el efecto in vitro de cepas probióticas contra *Candida albicans* ATCC 10231?

Este estudio tuvo el propósito de buscar opciones de tratamiento para controlar o prevenir el desarrollo de *Candida albicans*, principal especie asociada a candidiasis oral. Para ello se utilizó algunas cepas probióticas, ya que éstas son seguras para el consumo del ser humano según los estudios in vitro realizados. De la misma forma, se podría estimar la posibilidad de prevención para algunos pacientes capaces de contraerlas, debido a una mayor presencia de este tipo de infecciones en los últimos años por el incremento de factores de riesgo predisponentes como pacientes portadores de prótesis dentales, individuos inmunodeprimidos y pacientes sometidos a radioterapia.

Los estudios realizados hasta este momento donde se han utilizado fármacos, inmunosupresores, terapias y hasta recursos naturales como plantas medicinales como fue la investigación de Enríquez et al <sup>8</sup> quienes demostraron la efectividad antifúngica in vitro del extracto hidroetanólico de *Plantago major* (llantén) y de *Ruta graveolens* (ruda) en el control de *Candida albicans* no han tenido los resultados esperados en la salud de la población o solo se han quedado en estudios de laboratorio. Los estudios donde se hayan evaluado la efectividad de cepas probióticas en el control de *Candida albicans* o la prevención de la candidiasis oral no son muy abundantes en Sudamérica y el Perú.

En ese sentido para responder el problema de investigación se planteó el siguiente objetivo general: Comparar el efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Candida albicans* ATCC 10231. El cual se fundamenta en los siguientes objetivos específicos: Determinar el efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 contra *Candida albicans* ATCC 10231. Determinar el efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 contra *Candida albicans* ATCC 10231. Determinar el efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Candida albicans* ATCC 10231. Determinar el efecto *in vitro* *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Según los datos evidenciados se propusieron las siguientes hipótesis:

H1: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 posee efecto antifúngico contra *Candida albicans* ATCC 10231.

H2: *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 posee efecto antifúngico contra *Candida albicans* ATCC 10231.

H3: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee efecto antifúngico contra *Candida albicans* ATCC 10231.

H4: *Lactobacillus casei* ATCC 393 posee efecto antifúngico contra *Candida albicans* ATCC 10231.

## II. MARCO TEÓRICO

La presente investigación se fundamenta teóricamente en el estudio de Azad et al<sup>9</sup> (2021) en Irán, quienes estudiaron los efectos protectores del probiótico *Streptococcus thermophilus* sobre la morfogénesis de *Candida albicans* y un modelo murino de candidiasis oral Comparativo. La actividad inhibidora de *S. thermophilus* sobre *Candida* se evaluó por microdilución en caldo y mediante cultivo. Reportaron que el probiótico *S. thermophilus* inhibió el crecimiento, la formación de biopelículas y de tubos germinativos de *Candida albicans* en concentraciones de 16 a 512 µg/mL. También redujo significativamente las UFC en el estudio in vivo. Concluyeron que dada la actividad inhibidora de *S. thermophilus* contra el crecimiento, la transición y la formación de biopelículas de *C. albicans*, podría usarse en el tratamiento de la candidiasis oral.

Khalandi et al<sup>10</sup> (2020) en Irán, investigaron la actividad antifúngica del ácido cáprico producido por el probiótico *Saccharomyces boulardii* y sus interacciones *in vitro* con nistatina y fluconazol contra *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* aislados de la cavidad oral de recién nacidos con candidiasis orofaríngea. La cepa de referencia fue *C. albicans* ATCC 10231. Fue un estudio experimental in vitro. La interacción entre el ácido cáprico con fluconazol y nistatina se determinó siguiendo un método de tablero de ajedrez y los resultados se interpretaron utilizando un índice de concentración inhibitoria fraccional. La nistatina tuvo la CMI más baja (rango, 0.125-8 µg/mL) seguida de fluconazol (rango, 0.5-16 µg/mL) y ácido cáprico (rango, 128-2,048 µg/mL). Cuando se probó en combinación, el ácido cáprico con fluconazol demostró interacciones sinérgicas, indiferentes y antagonistas al igual que la combinación de ácido cáprico con nistatina. Concluyeron que el fluconazol, la nistatina y el ácido cáprico parecen ser más eficaces cuando se usan solos en comparación con su combinación. Se demostró que el ácido cáprico producido por *S. boulardii*, demuestra actividad antifúngica mediante la inhibición de la filamentación contra especies de *Candida*.

Salari et al<sup>11</sup> (2020) en Irán, evaluaron las propiedades antifúngicas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* sobre diferentes especies de *Candida* aisladas de la cavidad oral de pacientes con VIH / SIDA en comparación

con Fluconazol (FLC). El efecto antifúngico se determinó por el fenómeno de coagregación, interferencia de superposición de agar y ensayos de microdilución en caldo. Los resultados mostraron que la relación de coagregación más alta se observó para *C. krusei*. Tanto *L. acidophilus* como *L. plantarum* a concentraciones celulares de  $10^2$  UFC/mL pudieron inhibir el crecimiento de la mayoría de las especies orales de *Candida*, pero no de *C. albicans*. Tanto la MIC como la MFC se encontró entre 100 a 200  $\mu$ L/mL para *L. acidophilus* y de 50 a 200  $\mu$ L/mL para *L. plantarum* respectivamente. Concluyeron que *L. acidophilus* y *L. plantarum* tenían efectos antifúngicos contra las especies orales de *Candida*.

Allonsius et al<sup>12</sup> (2019) en Bélgica, evaluaron la inhibición de la morfogénesis de hifas de *Candida albicans* por quitinasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG. Fue un estudio experimental. Se seleccionaron cepas de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. crispatus*. La viabilidad de *Candida* durante la formación de hifas y los tratamientos inhibidores de hifas se verificó cuantificando el recuento en placa viable con el método de macrodilución en agar. Las tasas de inhibición mostraron una gran variación entre las cepas probadas, que van desde el 91% (*L. casei*) al 14% (*L. plantarum*). Al explorar la actividad de compuestos de *L. rhamnosus* GG, la principal peptidoglucano hidrolasa Msp1, se identificó como una molécula efectora clave responsable de la inhibición de *Candida*. Demostraron que la actividad de Msp1 se debía a su capacidad para degradar la quitina, el principal polímero de la pared celular de las hifas de *C. albicans*. Concluyeron que la identificación de una proteína específica de *Lactobacillus* con actividad quitinasa anti-hifas ayudará a una mejor selección de cepas probióticas y una aplicación mejorada en futuros ensayos clínicos para estrategias de control de *Candida*.

Mailander et al<sup>13</sup> (2017) en Alemania, estudiaron la utilización del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG en la prevención de las infecciones de la mucosa a causa de *Candida albicans*. Fue una investigación experimental para demostrar que *L. rhamnosus* protege el tejido epitelial bucal del daño causado por *C. albicans* en un modelo in vitro de candidiasis oral. También se analizaron los mecanismos detrás de la protección y los efectos directos e indirectos de *L. rhamnosus* en la patogenicidad *C. albicans*. Los resultados indicaron que si bien

*L. rhamnosus* no afectó la viabilidad de *C. albicans*, la presencia del probiótico evitó el daño epitelial al disminuir la virulencia del hongo. Determinaron que el mecanismo de afectación de la virulencia y patogenicidad por parte de *L. rhamnosus* se debió al agotamiento de la glucosa, la represión de la síntesis de ergosterol, y también debido a sitios de adhesión bloqueados. Concluyeron que *L. rhamnosus* protege el epitelio oral contra la infección por *C. albicans* mediante la inhibición de la adhesión, la invasión y el daño de hongos causada por la limitación de nutrientes.

Ribeiro et al<sup>14</sup> (2016) en Brasil, evaluaron los posibles efectos antifúngicos del probiótico *L. rhamnosus* ATCC 9595 sobre *C. albicans* ATCC 18804. Fue una investigación experimental con modelos *in vitro* e *in vivo*. El análisis *in vitro* evaluó los efectos del *L. rhamnosus* en la formación de biopelículas de *C. albicans* mediante el recuento de UFC, actividad metabólica, capacidad de filamentación, adhesión y la expresión del gen regulador de transcripción. Los resultados mostraron que *L. rhamnosus* redujeron la formación de biopelículas *in vitro*, la filamentación, y las UFC de *C. albicans*. Concluyeron que *L. rhamnosus* reduce significativamente las UFC, la filamentación y la capacidad de formar biopelícula de *C. albicans* en condiciones *in vitro* al regular negativamente la genética de *C. albicans*.

James et al<sup>15</sup> (2016) en Canadá, determinaron si la combinación de los probióticos *Lactobacillus plantarum* SD5870 y *Lactobacillus helveticus* CBS N116411, *Streptococcus salivarius* DSM 14685, fue efectivo en la inhibición de la formación y eliminación de biopelículas de *C. albicans* preformadas. Fue una investigación experimental *in vitro*. Sus resultados indicaron que la coincubación con sobrenadantes probióticos en condiciones inductoras de hifas reducen la formación de biopelículas de *C. albicans* en un 75% en todos los tratamientos. También enunciaron que las combinaciones de probióticos vivos reducen la formación de biopelícula de *C. albicans* en un 67%. Concluyeron que tanto los probióticos vivos como sus sobrenadantes y la combinación de estos reduce significativamente la formación de las biopelículas de *C. albicans* preformadas y son efectivos también en su eliminación.

Coman et al<sup>16</sup> (2015) En Italia, evaluaron *in vitro* la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* probióticos en la inhibición, adhesión, desplazamiento y competencia con cepas de *Candida* aisladas clínicamente. Fue una investigación experimental. Los probióticos utilizados fueron *Lactobacillus plantarum* 319, *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® y una combinación probiótica específica (SYNBIO) sobre la adhesión de patógenos de *Candida* en cultivo de células HeLa. La adhesión bacteriana de *Candida* al cultivo HeLa se cuantificó mediante microscopía después de la tinción de May-Grünwald/Giemsa. Los resultados sugieren que las cepas probióticas evaluadas podrían prevenir la colonización del tracto urogenital por patógenos relevantes como cepas de *Candida* a través de mecanismos de barrera e interferencia (principalmente desplazamiento y competencia), pero el grado de inhibición de la adhesión es dependiente de la cepa probiótica. Concluyen que las cepas probióticas de *Lactobacillus* presentan alto potencial como agentes antiinfecciosos contra *Candida albicans*.

Teóricamente se conoce que la salud bucodental es de gran importancia para tener una salud óptima y una buena calidad de vida, esta es definida por la Organización Mundial de la Salud como la falta de dolor orofacial , cáncer de boca o garganta , infecciones , enfermedades periodontales, caries y edentulismo.<sup>17</sup> La cavidad oral representa una parte fundamental de nuestro organismo , por eso el mantener un cuidado amplio de la misma es de suma importancia para que pueda cumplir sus funciones tales como la masticación , fonación y estética ; por otro lado la falta de cuidado puede afectar todo el organismo.<sup>18</sup>

La cavidad bucal contiene una gama muy extensa de microbiota que probablemente es la causante de diversos grados de infecciones en la cavidad oral en individuos que cuentan con factores de riesgo tales como el usar prótesis, el uso de antibióticos por un tiempo amplio, VIH/SIDA, pacientes con algún tratamiento para el cáncer, trasplante de órganos, diabetes y uso de corticoides.<sup>18</sup> Las enfermedades de la cavidad oral más prevalentes son tres: la caries dental, la gingivitis y la periodontitis crónica, estas afectan a 3,9 billones

de individuos, siendo mundialmente la de mayor prevalencia la caries dental sin tratar representando un 35% del total.<sup>19</sup>

La candidiasis es la infección más importante y con mayor prevalencia de la cavidad oral, generada por el hongo *Candida*. Esta puede presentar factores tanto locales como el uso de aparatos intra orales, uso de inhaladores esteroideos, la reducción del flujo salival, y dieta rica en carbohidratos; como factores sistémicos tales como recién nacidos o ancianos, trastornos endocrinos, individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes, terapia antibiótica de amplio espectro y desnutrición.<sup>20</sup> Las presentaciones clínicas incluyen candidiasis eritematosa, pseudomembranosa, glositis romboidal mediana, queilitis angular y leucoplasia.<sup>21</sup> La pseudomembranosa aguda es la forma que se observa clásicamente en los recién nacidos y los pacientes inmunocomprometidos.<sup>22</sup>

La queilitis angular es común y fácilmente tratable, sin embargo, el tratamiento es largo y no garantiza que no haya incidencia. Los factores más importantes de predisposición son la disminución de la dimensión vertical, así como el aumento de la laxitud dérmica debido a la edad. Esto crea una situación en la que la contaminación salival de la piel es inevitable. El paciente puede ser asintomático o presentar eritema y fisuras en las comisuras labiales. La aplicación de una mezcla de clotrimazol 1% en una proporción de uno a uno con mupirocina al 2% ha sido muy efectiva y predecible en la práctica clínica. El uso de un antimicótico solo suele ser eficaz, sin embargo, el esteroide reduce la inflamación, pero también puede contribuir a un aumento de la o la colonización por hongos.<sup>23</sup>

La glositis romboidal media es un problema cosmético solamente, la naturaleza dolorosa de esta forma es lo que llevará al paciente a la clínica. Una versión aguda de los síntomas del tipo boca-lengua ardiente se describe sintomáticamente como sensibilidad de la mucosa, así como un aumento de la sensibilidad a varios alimentos y agentes saborizantes se pueden realizar pruebas diagnósticas citológicas, aunque un diagnóstico clínico empírico suele ser suficiente para iniciar la terapia. Se aplica el mismo enfoque terapéutico de la candidiasis pseudomembranosa aguda. Si hay algunos problemas de sensibilidad de la lengua, se pueden emplear agentes tópicos como se describe en la candidiasis atrófica aguda.<sup>23</sup>

Un número de especies medicamente importantes de *Candida* como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. tropicales* forman parte del microbioma oral y su proliferación no controlada y un sistema inmune deprimido causa infecciones. Entre todas estas especies, *C. albicans* ha sido reportada como la causante más común de candidiasis oral y su propensión a formar biofilm ha llevado a la aparición de resistencia antifúngica a los agentes antimicóticos comúnmente utilizados como son los azoles, equinocandinas, anfotericina B y flucitosina<sup>3</sup>, puesto que, entre todas las especies de *Cándida*, la que con mayor frecuencia ocasiona candidiasis es la *C. albicans*, numerosos clínicos consideran candidiasis oral como sinónimo de infección por *C. albicans*.<sup>3</sup>

La presencia de especies del género *Candida* en la cavidad oral es un hallazgo habitual (7-65%). No obstante, son muy escasos los portadores que sufren infecciones por *Cándida*. Las concentraciones de *Candida* en portadores sanos son muy inferiores a las concentraciones halladas en personas que padecen distintas formas de candidiasis, 300-800 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) de saliva frente a recuentos superiores a 20000 UFC/ml, respectivamente. Estos datos tienen un valor limitado puesto que personas sanas pueden tolerar concentraciones altas de *Cándida* sin padecer la enfermedad, mientras que recuentos más bajos pueden precipitarla en personas debilitadas. La incidencia real de este proceso se desconoce.<sup>3,4</sup>

A pesar de que la *C. albicans* es la especie oral más prevalente y la que frecuentemente se comporta como patógena, se han conseguido aislar en el ser humano cerca de 20 géneros y casi 90 especies de levaduras. La mayoría son del género *Candida*, aunque hay otras especies micóticas como la *Rhodotorula glutinis* y *Saccharomyces cerevisiae*, que también se encuentran en la cavidad oral ocasionalmente y no se conoce que causen infecciones. Para que *C. albicans* pase de su estado comensal a patógeno, deben expresarse los factores de virulencia, alteración de los mecanismos de defensa frente a la infección candidiásica, una interacción huésped-microorganismo y la participación de factores predisponentes indispensables para que se produzca la infección.<sup>3</sup>

*C. albicans* es un hongo pleomórfico. Su crecimiento natural es levaduriforme, sin embargo, bajo ciertas condiciones puede formar pseudo-hifas o hifas



verdaderas. La patogenicidad está asociada con el crecimiento invasivo de hifas, mientras que el comensalismo de *C. albicans* ocurre en su mayoría en la forma de células de levadura adheridas ya que las células epiteliales no las reconocen eficientemente. Los factores clave de virulencia de *C. albicans* incluyen la formación de biopelículas, contrarrestando la inmunidad innata del huésped, evasión del sistema inmunológico, adherencia a la superficie del huésped, transición de levadura a hifas y producción de candidalísina, esta es una toxina peptídica citolítica expresadas principalmente por las hifas que dañan directamente membranas epiteliales.<sup>24</sup>

El tratamiento de la candidiasis oral debe basarse en el tipo de manifestación, el estado inmunológico del huésped, y grado de implicación o falta de respuesta a terapias anteriores.<sup>22</sup> Un aspecto importante de la terapia es la eliminación o el tratamiento de cualquier causa subyacente o factores de riesgo identificables sin embargo no siempre es posible eliminar la causa subyacente, y una buena higiene oral puede que no sea suficiente. Además, algunos casos de candidiasis pueden causar demasiadas molestias, lo que requiere el uso de una variedad de tratamientos, incluyendo tópicos y agentes antimicóticos sistémicos. El mecanismo de acción de estas modalidades de tratamiento implica la colección intracelular de peróxido, que daña la membrana celular fúngica.<sup>25</sup>

Para casos leves de candidiasis, los agentes antimicóticos tópicos pueden ser suficientes. Para las enfermedades resistentes a los medicamentos tópicos, los pacientes en riesgo de la candidiasis diseminada y en los pacientes inmunocomprometidos, el antifúngico sistémico es la terapia indicada. En cuanto a agentes tópicos la violeta de genciana es un medicamento fungicida que también tiene un efecto con propiedades antiestafilocócico. Violeta de genciana se aplica dos veces al día 1,5 ml de solución al 0,5%. La nistatina es un antimicótico de polietileno que se deriva de la especie *Streptomyces*. Se dirige a las membranas celulares fúngicas. La nistatina se une al ergosterol y forma poros para interrumpir la permeabilidad de la membrana celular fúngica.<sup>25,26</sup>

La anfotericina B es otro agente antimicótico tópico de polietileno. Se aplica en forma de pomada tres o cuatro veces al día durante un máximo de 2 semanas. El miconazol es un medicamento antimicótico tópico de imidazol. Tiene

propiedades fungistáticas, inhibe la síntesis de ergosterol en la membrana plasmática de los hongos. Se administra en gel tres o cuatro veces al día durante 2-4 semanas. El ketoconazol es otro agente antimicótico de imidazol. Se administra como crema al 2% dos o tres veces al día durante 14 a 28 días. El clotrimazol es un agente tópico con propiedades anti estafilocócicas. Sólo se utiliza como agente tópico debido a su potencial toxicidad gastrointestinal. Se administra en forma de crema dos o tres veces al día durante 3 semanas.<sup>25-27</sup>

En cuanto a los antimicóticos sistémicos el Ketoconazol es un agente antifúngico y forma parte de la categoría de los medicamentos de imidazol. El ketoconazol 200 mg se toma por vía oral una o dos veces al día durante dos semanas. El Fluconazol es un agente antifúngico triazol, puede tomarse con una dosis inicial de 200 mg el día 1, y luego diariamente durante 7 a 14 días en varias dosis: 50 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg o 3 mg/kg/día. El itraconazol es un agente antimicótico triazol que resulta útil para atacar las cepas de candidas resistentes al fluconazol, entre ellas *C. glabrata* y *C. krusei*. La cápsula de itraconazol debe tomarse 100 o 200 mg diarios durante 14 días. Si el paciente tiene un cuadro severo se administra una dosis de 200 mg tres veces al día durante 3 días.<sup>26-28</sup>

Por otro lado los probióticos se han utilizado para prevenir y tratar las enfermedades asociadas a la candida en pacientes pediátricos y adultos.<sup>27</sup> El vocablo “probiótico”, en oposición al termino antibiótico, fue expuesto por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell.<sup>25</sup> La Organización Mundial de la Salud define a los probióticos como microorganismos vivientes que, cuando son administrados en grupos controlados correctos, otorgan beneficios en el organismo del hospedero.<sup>26</sup> Los mecanismos conocidos de los probióticos incluyen la regulación de la inmunidad innata, adquirida y la liberación de antioxidantes y bacteriocinas a restaurar el equilibrio de la comunidad microbiana y el sistema inmunológico.<sup>25</sup>

Científicamente ha sido comprobado que el uso de probióticos mejora la situación de los pacientes con afecciones medicas principalmente gastrointestinales. A través de los últimos años el uso de estos ha generado gran interés dentro del ámbito de la odontología, siendo motivo de estudios con un enfoque en reducir la caries dental, mejoras en el pronóstico de enfermedades periodontales, eliminar infecciones como candidiasis oral.<sup>28</sup> El enfoque con la

terapia con probióticos en la cavidad oral se basa en la hipótesis de que las bacterias inofensivas podrían ocupar un espacio en una biopelícula que de otra manera sería colonizada por un patógeno. Es importante destacar que el efecto es específico de la cepa.<sup>25</sup>

Los efectos de una cepa probiótica no deben generalizarse porque diferentes cepas ejercen diferentes efectos.<sup>25</sup> La literatura científica se centra en gran medida en diversas cepas, que van desde los probióticos clásicos, como las bacterias *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* o la levadura *Saccharomyces boulardii*, a candidatos más recientes, como *A. muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii*, que se consideran bacterias beneficiosas de la siguiente generación.<sup>29</sup>

Ha sido descrito que los probióticos pueden modular la respuesta inmune en animales tanto como humanos a nivel sistémico. En algunos estudios se han observado diferencias entre la composición de la flora microbiana de pacientes alérgicos y sanos. Por esto y dadas sus propiedades inmunomoduladores, han enfocado en la posibilidad de utilizar los probióticos para la prevención y/o tratamiento de alergias. Por otro lado, estudios demuestran que la adición de probióticos a bebidas lácteas contribuye a disminuir el estreñimiento. En el síndrome de intestino irritable (SII) diversos estudios clínicos tanto en niños como en adultos han mostrado efectos significativos del consumo de probióticos sobre la frecuencia y severidad del dolor en el SII.<sup>30</sup>

El uso de probióticos para inhibir los microorganismos patógenos podría ser una estrategia interesante para controlar las infecciones oportunistas debido a sus efectos antagónicos en otros microorganismos mediante la liberación de moléculas específicas, como el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas. Varias especies de microorganismos son conocidas por sus efectos probióticos, como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces cerevisiae*, algunas cepas de *Lactobacillus* pueden interactuar con *C. albicans* y parecen inhibir la filamentación de esta cepa, lo que resulta en la inhibición del crecimiento<sup>31</sup>, producción de ácidos, bacteriocinas, biosurfactantes, hidrógeno peróxido y moléculas de coagulación.<sup>4</sup>

Los probióticos pueden estimular el sistema inmunológico de su huésped a través de la activación celular que resultará en la producción de interleucinas,

como el factor de necrosis tumoral, IL-1b, IL-6, e IL-17 que son importantes y que se dirigen a las respuestas inmunes a los hongos, contribuyendo a un sistema inmunológico más competente contra las infecciones de *C. albicans*. La adhesión a la superficie de la célula anfitriona en el organismo es el primer paso en la patogénesis de *C. albicans*, lo que permite la colonización fúngica en un nicho específico y el desarrollo del proceso de infección. Una vez que este proceso se bloquea, *C. albicans* no puede adherirse o se puede eliminar fácilmente, resultando en la no colonización de los tejidos.<sup>32</sup>

En la presente investigación trabajaremos con cuatro cepas probióticas las cuales son: Presentamos del género *Lactobacillus* spp.; son bacilos facultativamente anaeróbicos, catalasa negativos, grampositivos, no formadores de esporas que a menudo crecen mejor en condiciones microaerófilas.<sup>33</sup> Se considera que *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 tiene características probióticas; presenta un metabolismo homofermentativo, es una bacteria anaeróbica y sus condiciones óptimas de crecimiento son a 30-45 °C y un pH 4-5. (tesis). Habita de manera natural en una gran variedad de alimentos. Tanto a nivel experimental como industrial se utiliza a esta bacteria en la elaboración de quesos. Cuando se encuentran en suficiente proporción son considerados como probióticos, los cuales son capaces de modificar favorablemente el balance de la microflora intestinal, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y también potencian el funcionamiento del sistema inmunológico.<sup>34</sup>

Los *Lactobacillus casei* son un tipo de bacteria probiótica muy eficaz para equilibrar la microflora intestinal, regular el sistema inmune específicamente de la respuesta inmune celular Industrialmente, *L. casei* tiene aplicaciones como probióticos en humanos, como cultivo iniciador ácido-productor para fermentaciones de leche y especialmente como cultivos para la intensificación y aceleración de desarrollo de sabores en ciertas variedades de quesos madurados con bacterias.<sup>35</sup>

Respecto a *Bifidobacterium animalis* las técnicas modernas de clasificación molecular reclasificaron la *Bifidobacterium* como *Bifidobacterium animalis*.<sup>36</sup> Esta cepa está tecnológicamente bien adaptada, ya que expresa actividad de fermentación, alta aerotolerancia, buena estabilidad y una gran tolerancia a los

ácidos y la bilis, también como productos liofilizados en los suplementos dietéticos. Además, BB-12 no tiene efectos adversos en el sabor, el aspecto o la sensación bucal de los alimentos y es capaz de sobrevivir en los alimentos probióticos hasta su consumo. El BB-12 se origina en la colección de cultivos lácteos de Chr. Hansen. Es una cepa que fue especialmente seleccionada por el para la producción de productos lácteos probióticos. BB-12 se ha utilizado en fórmulas infantiles, suplementos dietéticos y productos de leche fermentada en todo el mundo.<sup>37</sup>

El probiótico *Lactococcus lactis* ha sido utilizado durante muchos años para la fermentación de alimentos, especialmente queso, lo que hace que la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) lo reconozca generalmente como seguro. *L. lactis* es una bacteria del ácido láctico (LAB) también produce ácido que conserva los alimentos. Se divide en tres subespecies: *L. lactis* ssp. *lactis*, *L. lactis* ssp. *cremoris* y *L. lactis* ssp. *hordniae*. Fenotípicamente, se clasifica como una bacteria intestinal anaeróbica facultativa, grampositiva, esférica, homolactada, no esporulante y facultativa con cientos de cepas y biovariantes publicadas hasta la fecha<sup>38</sup> *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es un gram-positivo no patógeno.<sup>39</sup>

### III. METODOLOGÍA

#### 3.1. Tipo y diseño de investigación

La presente investigación fue de naturaleza básica, y de diseño experimental verdadero, ya que la variable independiente fue manipulada por los investigadores para poder observar los cambios efectuados en la variable dependiente.<sup>40</sup>

#### 3.2. Variables y operacionalización

La investigación incluyó el estudio de dos variables, ambas de tipo cuantitativo: Una variable independiente; las cepas probióticas, y una variable dependiente; que es el efecto in vitro contra *Candida albicans*.

#### 3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis

La población estuvo conformada por las cepas probióticas: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 y *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527.

La muestra estuvo constituida por las concentraciones (inóculo) de  $1,5 \times 10^8$  y  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de cada una de las cepas probióticas evaluadas.

En la investigación el muestreo fue equivalente al cálculo de las unidades de ensayo replicados de la investigación (Anexo3).

Las unidades de ensayo fueron 90. De acuerdo a la siguiente descripción.

Ensayo 1: Concentración  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *L. acidophilus* = 10 replicados.

Ensayo 2: Concentración  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de *L. acidophilus* = 10 replicados.

Ensayo 3: Concentración  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *L. casei* = 10 replicados.

Ensayo 4: Concentración  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de *L. casei* = 10 replicados.

Ensayo 5: Concentración  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *L. lactis* = 10 replicados.

Ensayo 6: Concentración  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de *L. lactis* = 10 replicados.

Ensayo 7: Concentración  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *B. animalis* = 10 replicados.

Ensayo 8: Concentración  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de *B. animalis* = 10 replicados.

Ensayo 9: Concentración 100000 UI/mL Nistatina (Control) = 10 replicados.

### **3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

La investigación fue de diseño experimental. En ese sentido se hizo uso de metodologías estandarizadas<sup>16</sup> a nivel internacional para garantizar la fiabilidad de los resultados. Se utilizó el método turbidimétrico<sup>48</sup> para la preparación de los inóculos, tanto para las cepas probióticas como para *C. albicans*. Como instrumento de recolección de datos, se utilizó un Espectrofotómetro marca: Kyntel; Modelo: VIS-KV-1200. Para la preparación de los medios de cultivo y las condiciones microbiológicas de cultivo se aplicó protocolos recomendados por el *Clinical And Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>49</sup>. La evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* se realizó por el método de difusión en disco.

### **3.5. Procedimientos**

#### **Adquisición de cepas probióticas y de *Candida albicans***

Todas las cepas que se utilizaron en la presente investigación fueron cepas de referencia certificadas. Fueron adquiridas de GenLab del Perú S.A.C. Las cepas fueron: *Candida albicans* ATCC 10231, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 y *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527.

#### **Medios de cultivo y condiciones de cultivo**

Los medios de cultivos utilizados fueron el caldo Soya Trypticasa para reactivación de las cepas probióticas y caldo Sabouraud-dextrosa para el mantenimiento de *Candida albicans*. La evaluación del efecto inhibitorio *in vitro* se realizó en Agar TSA. Todos los medios de cultivo empleados fueron de la marca Merck, con certificación de calidad ISO 11133.

### **Reactivación de cepas probióticas y de *Candida albicans***

Las cepas probióticas y de *Candida albicans* se adquirieron en estado liofilizado por lo que tuvieron que ser reactivadas. Para la reactivación de las cepas probióticas se utilizó el medio de cultivo caldo Soya Tripticasa. Por su parte *C. albicans* su reactivación se realizó en caldo Sabouraud-dextrosa en condiciones de microaerofilia a 37 C° durante 24 horas.

### **Preparación del inóculo microbiano**

El número de unidades formadoras de colonia (UFC) en suspensión de todas las cepas microbianas que se utilizaron en el estudio se determinaron espectrofotométricamente. Se obtuvo dos concentraciones estándar de  $1,5 \times 10^8$  y  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL para las cepas probióticas y de  $1,5 \times 10^7$  UFC/mL para *C. albicans*. La densidad óptica (absorbancia) y la longitud de onda fue de 0,381 y 530 nm para *C. albicans*, y de 0,296 y 600 nm para las cepas probióticas. Las densidades de células de los inóculos se confirmaron mediante el recuento de UFC/mL en medio de cultivo sólido.

### **Prueba de susceptibilidad de *Candida albicans***

La cepa estándar *C. albicans* ATCC 10231 fue propagada en Agar Sabouraud (MERCK) durante 24 horas a 37°C en aerobiosis. La prueba de difusión en disco de las cuatro cepas probióticas se realizó tal como lo describe el Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI) en la norma M44-A, con una pequeña modificación al reemplazar el medio de cultivo Mueller-Hinton agar por el TSA. La superficie de agar se inoculó por dispersión en superficie con un hisopo sumergido en el inóculo de *C. albicans*. Las placas se secaron a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de colocar los discos de susceptibilidad en la superficie. Los discos de susceptibilidad fueron de papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro y 1 mm de espesor y embebidos con el inóculo de las dos concentraciones de los probióticos y el control y se colocó en la superficie de las placas inoculadas con. Las unidades de ensayos (placas inoculadas) se incubaron a 37°C durante 24 h después de las cuales se midió los diámetros de los halos de inhibición formados alrededor de los discos. Los ensayos se hicieron por nonuplicado.



### **3.6. Método de análisis de datos**

Todos los ensayos experimentales del estudio se realizaron por nonuplicado y los datos se representaron como media del halo de inhibición en mm  $\pm$  SD (media  $\pm$  desviación estándar). El software utilizado fue SPSS v.26. Se aplicaron pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se analizaron utilizando ANOVA unidireccional y el análisis post hoc de Tukey para establecer diferencias significativas entre las comparaciones múltiples de los tratamientos. El nivel de confianza fue del 95%. los valores  $P \leq 0,05$  se considerarán significativos.

### **3.7. Aspectos éticos**

A nivel de investigaciones experimentales los aspectos éticos consisten en la utilización responsable y segura de los microorganismos.<sup>50</sup> En ese sentido se siguieron todos los protocolos de bioseguridad establecidos en los manuales de operatividad del laboratorio de investigación Science Experiment E.I.R.L. de la ciudad de Trujillo. También se cumplieron los manuales de gestión de residuos peligrosos y biocontaminados del laboratorio, del Ministerio de Salud (MINSA)<sup>51</sup> y de Organización Mundial de la Salud (OMS).<sup>52</sup>

#### IV. RESULTADOS

Tabla 1. Comparación del efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Candida albicans* ATCC 10231.

SUSTANCIA	Concentración UFC/mL	Diámetro de halo de inhibición en mm			
		Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
<i>L. casei</i> ATCC 393	1,5 x10 <sup>9</sup>	6,55			
<i>L. casei</i> ATCC 393	1,5 x10 <sup>8</sup>	6,75			
<i>L. lactis</i> ATCC 11454	1,5 x10 <sup>8</sup>		7,30		
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 x10 <sup>9</sup>		7,34		
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 x10 <sup>8</sup>			7,40	
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 <sup>8</sup>			7,51	
<i>L. lactis</i> ATCC 11454	1,5 x10 <sup>9</sup>			7,65	
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 <sup>9</sup>			7,86	
Nistatina	100000 UI/mL				14,06
Sig.		0,929	0,371	0,084	1,000

\* Sig.= p= Significancia (HSD Tukey<sup>a</sup>).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 1 se reportan los subconjuntos (grupos) formados después de aplicada la prueba de comparaciones múltiples de Tukey a los promedios de halos de inhibición formados por las concentraciones de los probióticos sobre *C. albicans* ATCC 10231. Un subconjunto es la agrupación de medias que no presentan diferencias estadísticas significativas por lo que se consideran iguales ( $p > 0,05$ ). Se evaluaron 2 concentraciones de 4 probióticos, adicionando el control haría teóricamente un total de 9 subconjuntos de ensayo, sin embargo, se observan solo 4 subconjuntos lo que significa que hay efectos inhibitorios que estadística son iguales y por ello han sido agrupados. Se observa que el subconjunto 1 lo conforman la media de los halos de inhibición de ambas concentraciones del probiótico *L. casei* (6,55 mm y 6,75 mm). En el subconjunto 2 se aprecian agrupados los efectos inhibitorios de la concentración 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/mL de *L. lactis* y la concentración 1,5 x10<sup>9</sup> UFC/mL de *L. acidophilus* (media de halos de inhibición de (7,30 mm y 7,34 mm respectivamente). El subconjunto 3 agrupa las medias de inhibición de la concentración de 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/mL de *L. acidophilus* y *B. animalis*, así como las medias de inhibición de la concentración tanto de 1,5 x10<sup>9</sup> UFC/mL de *L. lactis* como de *B. animalis*. El subconjunto 4 solo concentra la media de inhibición del control positivo nistatina (14,06 mm).

Tabla 2. Efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 contra *Candida albicans* ATCC 10231.

SUSTANCIA	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	<i>p</i> **
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	1,5 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	7,30	0,176	Fungistático	0,371
	1,5 x10 <sup>9</sup> UFC/mL	7,65	0,403	Fungistático	
Nistatina	100000 UI/mL	14,06	0,501	Fungicida	0,000

\*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

\*\* *p*= Significancia (HSD Tukey<sup>a</sup>).

Fuente: Análisis estadístico

La tabla 2 muestra el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 y el control positivo Nistatina 100000 UI/mL contra *Candida albicans* ATCC 10231. La concentración de 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 7,30 ± 0,176 mm y la concentración de 1,5 x10<sup>9</sup> UFC/mL un halo promedio de 7,65 ± 0,403 mm. En este caso, el efecto inhibitorio es indiferente de la concentración del probiótico. Sin embargo, ambos efectos son equivalentes al efecto antifúngico de tipo fungistático. El control positivo, Nistatina 100000 UI/mL formo un halo de 14,06 ± 0,501 mm equivalente a efecto antifúngico de tipo Fungicida. No existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico (*p*>0,05) pero si respecto al control (*p*<0,05).

Tabla 3. Efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 contra *Candida albicans* ATCC 10231.

SUSTANCIA	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	p**
<i>Bifidobacterium animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	7,51	0,280	Fungistático	0,371
	1,5 x10 <sup>9</sup> UFC/mL	7,86	0,287	Fungistático	
Nistatina	100000 UI/mL	14,06	0,501	Fungicida	0,000

\*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

\*\* p= Significancia (HSD Tukey<sup>a</sup>).

Fuente: Análisis estadístico

La tabla 3 muestra el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 y el control positivo Nistatina 100000 UI/mL contra *Candida albicans* ATCC 10231. La concentración de 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 7,51 ± 0,280 mm y la concentración de 1,5 x10<sup>9</sup> UFC/mL un halo promedio de 7,86 ± 0,287 mm. Se observa que el efecto inhibitorio es indiferente de la concentración del probiótico. Sin embargo, el efecto de ambas concentraciones del probiótico son equivalentes al efecto antifúngico de tipo fungistático. El control positivo, Nistatina 100000 UI/mL formo un halo de 14,06 ± 0,501 mm equivalente a efecto antifúngico de tipo Fungicida. No existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico (p>0,05) pero si respecto al control (p<0,05).

Tabla 4. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Candida albicans* ATCC 10231.

SUSTANCIA	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	$p^{**}$
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	7,40	0,339	Fungistático	1,000
	1,5 x10 <sup>9</sup> UFC/mL	7,34	0,394	Fungistático	
Nistatina	100000 UI/mL	14,06	0,501	Fungicida	0,000

\*D. E= Desviación estándar

\*\*  $p$ = Significancia

Fuente: Análisis estadístico

La tabla 4 muestra el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y el control positivo Nistatina 100000 UI/mL contra *Candida albicans* ATCC 10231. La concentración de 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 7,40 ± 0,339 mm y la concentración de 1,5 x10<sup>9</sup> UFC/mL un halo promedio de 7,34 ± 0,394 mm. Se observa que el efecto inhibitorio es indiferente de la concentración del probiótico. Sin embargo, el efecto de ambas concentraciones son equivalentes al efecto antifúngico de tipo fungistático. El control positivo, Nistatina 100000 UI/mL formo un halo de 14,06 ± 0,501 mm equivalente a efecto antifúngico de tipo Fungicida. No existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico ( $p > 0,05$ ) pero si respecto al control ( $p < 0,05$ ).

Tabla 5. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Candida albicans* ATCC 10231.

SUSTANCIA	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	$p^{**}$
<i>Lactobacillus casei</i>	1,5 x10 <sup>8</sup> UFC/mL	6,75	0,359	Fungistático	0,929
ATCC 393	1,5 x10 <sup>9</sup> UFC/mL	6,55	0,246	Fungistático	
Nistatina	100000 UI/mL	14,06	0,501	Fungicida	0,000

\*D. E= Desviación estándar

\*\*  $p$ = Significancia

Fuente: Análisis estadístico

La tabla 5 muestra el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 393 y el control positivo Nistatina 100000 UI/mL contra *Candida albicans* ATCC 10231. La concentración de 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/mL del probiótico formó un halo de inhibición promedio de 6,75 ± 0,359 mm y la concentración de 1,5 x10<sup>9</sup> UFC/mL un halo promedio de 6,55 ± 0,246 mm. Se observa que el efecto inhibitorio es indiferente de la concentración del probiótico. Sin embargo, el efecto de ambas concentraciones son equivalentes al efecto antifúngico de tipo fungistático. El control positivo, Nistatina 100000 UI/mL formó un halo de 14,06 ± 0,501 mm equivalente a efecto antifúngico de tipo Fungicida. No existe diferencia estadísticamente significativa entre las dos concentraciones del probiótico ( $p > 0,05$ ) pero si respecto al control ( $p < 0,05$ ).

## V. DISCUSIÓN

*Candida albicans* es un hongo comensal habitante normal de la boca de los seres humanos, no patógeno, sin embargo, bajo ciertas circunstancias asociadas principalmente a los pacientes puede expresar cierto grado de patogenicidad y virulencia y provocar una infección fúngica. Actualmente existen diversos reportes de cepas de *C. albicans* resistentes a los diversos compuestos antifúngicos existentes en el mercado. Esta realidad que se ha convertido en una problemática de salud pública mundial ha puesto de manifiesto la necesidad de buscar otras alternativas que permitan controlar a este microorganismo sin el efecto colateral de desarrollo de resistencia.

Es así, que hace algunos años toma importancia el uso de probióticos para controlar diversos microorganismos de interés estomatológico incluido *C. albicans*, principal responsable de la candidiasis oral. Mishra et al <sup>41</sup> establece que los probióticos pueden inhibir el desarrollo de microorganismos a nivel oral mediante el fenómeno de coagregación, adhesión competitiva, producción de sustancias antagonistas como ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, diacetilo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y bacteriocinas. Así mismo, Allonsius et al<sup>12</sup> purificó la principal peptidoglicano hidrolasa de *Lactobacillus rhamnosus* denominada Msp1 demostrando su actividad quitinasa (capacidad para degradar la quitina que es el principal polímero de la pared celular de *C. albicans*). Sin embargo, ese no es el único mecanismo utilizado por el probiótico *L. rhamnosus* para inhibir a *C. albicans* pues también estableció que otras formas de inhibición incluían el agotamiento de la glucosa, la represión de la síntesis de ergosterol, y también mediante el bloqueo de sitios de adhesión. También comprobó que el ácido láctico producido por las diferentes especies probióticas de *Lactobacillus* es un metabolito bioactivo clave en la inhibición de *C. albicans*. Similar efecto inhibitorio contra *C. albicans* es el que expresa el ácido cáprico, un ácido graso de 10 carbonos de cadena media extraído del probiótico *Saccharomyces boulardii*.<sup>10</sup>

En la presente investigación se reporta que a la concentración  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis* y *B. animalis* formaron halos de inhibición promedio de  $7,40 \pm 0,339$  mm;  $6,75 \pm 0,359$  mm;  $7,30 \pm 0,176$  mm y de  $7,51 \pm 0,280$  mm respectivamente. Mientras que con la concentración de  $1,5 \times 10^9$

UFC/mL siguiendo el mismo orden se formaron halos de inhibición promedio de  $7,34 \pm 0,394$  mm;  $6,55 \pm 0,246$  mm;  $7,65 \pm 0,403$  mm y  $7,86 \pm 0,287$  mm respectivamente. El control positivo Nistatina 100000 UI/mL formó un halo de inhibición promedio de  $14,06 \pm 0,501$  mm. En todos los casos de los probióticos el efecto antifúngico fue de tipo fungistático. Solo el control positivo expresó efecto antifúngico de tipo fungicida. Estos resultados se fundamentan en lo comunicado por Azad et al<sup>9</sup> quienes estudiaron los efectos protectores del probiótico *Streptococcus thermophilus* sobre la morfogénesis de *Candida albicans*. Ellos establecieron que a la concentración de 16 a 512  $\mu\text{g/mL}$  del probiótico *S. thermophilus* se logra inhibir el crecimiento de *C. albicans*, la formación de biopelículas y de su tubo germinativo que es uno de sus factores de virulencia importantes. Similares resultados obtuvieron Khalandi et al<sup>10</sup>, pero investigando la actividad antifúngica del ácido cáprico producido por el probiótico *Saccharomyces boulardii* y sus interacciones *in vitro* con nistatina y fluconazol contra *C. albicans*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* aislados de la cavidad oral de recién nacidos con candidiasis orofaríngea. Ellos establecieron que una concentración de ácido cáprico probiótico en el rango de 128-2,048  $\mu\text{g/mL}$  demuestra actividad antifúngica mediante la inhibición de la filamentación de diferentes especies de *Candida* incluida *C. albicans*.

Por su parte, Salari et al<sup>11</sup> evaluaron las propiedades antifúngicas de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* sobre diferentes especies de *Candida* aisladas de la cavidad oral de pacientes con VIH / SIDA en comparación con Fluconazol. Establecieron que la mayor inhibición por el fenómeno de coagregación se logró con *C. krusei*. Así mismo, tanto *L. acidophilus* como *L. plantarum* a concentraciones celulares de  $10^2$  UFC/mL pudieron inhibir el crecimiento de la mayoría de las especies orales de *Candida*, sin embargo, no fueron muy efectivos contra *C. albicans*. Estos resultados se relacionan con los obtenidos en la presente investigación pues como se ha mencionado los halos de inhibición de *L. acidophilus* fueron muy pequeños, en consecuencia, se deduce que su efecto inhibitorio no fue tan potente y por ello solo se puede hablar de efecto fungistático mas no fungicida.



En ese sentido, Allonsius et al<sup>12</sup>, evaluaron la inhibición *Candida albicans* por quitinasa de *Lactobacillus rhamnosus* GG. Ellos evaluaron múltiples cepas probióticas incluidas las de *L. casei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. crispatus*. Reportaron tasas de inhibición del 91% con *L. casei* y del 14% con *L. plantarum*. Sus resultados permiten fundamentar por qué algunos componentes producidos por los probióticos tienen efecto antifúngico. Tal es el caso de la peptidoglicanohidrolasa Msp1 de *L. rhamnosus*, que tiene la capacidad para degradar la quitina que es el principal polímero de la pared celular de *C. albicans*. Una vez destruida la pared celular del hongo y si este no pudo reproducirse asexualmente mediante gemación entonces lograría su inhibición temporal o permanente. Estas afirmaciones se fundamentan con los resultados publicados por Mailander et al<sup>13</sup> y Ribeiro et al<sup>14</sup>, quienes utilizando el mismo probiótico *L. rhamnosus* GG lograron demostrar su capacidad para proteger el tejido epitelial bucal del daño causado por *C. albicans* al disminuir su virulencia, bloquear los sitios de adhesión de esta al epitelio y colocar al hongo en un estado de inanición debido al agotamiento de la glucosa. Además de la capacidad de reprimir la síntesis de ergosterol que es el principal lípido complejo de la membrana celular de *C. albicans* y de todos los hongos. Además, lograron afectar la capacidad de la levadura de formar biopelícula al inhibir su capacidad de filamentación y adhesión.

Al respecto, James et al<sup>15</sup>, determinaron si la combinación de los probióticos *Lactobacillus plantarum* SD5870 y *Lactobacillus helveticus* CBS N116411, *Streptococcus salivarius* DSM 14685, fue efectivo en la inhibición de la formación y eliminación de biopelículas de *C. albicans* preformadas. Ellos reportaron que que las combinaciones de probióticos vivos reducen la formación de biopelícula de *C. albicans* en un 67%. Similares resultados obtuvieron Coman et al<sup>16</sup>, quienes evaluaron *in vitro* la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* probióticos en la inhibición, adhesión, desplazamiento y competencia con cepas de *Candida* aisladas clínicamente. Sus resultados sugieren que las cepas probióticas evaluadas podrían prevenir la colonización del tracto urogenital por patógenos relevantes como cepas de *Candida* a través de mecanismos de barrera e interferencia (principalmente desplazamiento y competencia), pero el grado de inhibición de la adhesión es dependiente de la cepa probiótica.

Como se ha podido analizar, las distintas especies probióticas como tal tienen potencial antimicrobiano de amplio espectro. Su capacidad antifúngica no se reduce a un solo mecanismo inhibitorio, sino que es multipunto, lo cual es muy importante porque imposibilita al patógeno la posibilidad de evadir la acción antimicrobiana o de desarrollar resistencia a dicho efecto. Estas amplias posibilidades permiten afirmar que en un futuro cercano una de las propuestas más prometedoras para contrarrestar el perjuicio causado por microorganismos patógenos de interés estomatológico será la terapia probiótica.

## VI. CONCLUSIONES

1. La comparación indica que el efecto inhibitorio de las dos concentraciones del probiótico *L. casei* sobre *Candida albicans* ATCC 10231 son estadísticamente iguales. Lo mismo sucede con la concentración  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *L. lactis* que es semejante a la concentración  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de *L. acidophilus*. Del mismo modo, la el efecto de la concentración de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *L. acidophilus* y *B. animalis* son iguales; tal como el efecto inhibitorio de la concentración  $1,5 \times 10^9$  UFC/mL de *L. lactis* y de *B. animalis*. La media de inhibición del control positivo nistatina fue diferente y superior a la de todos los probióticos.
2. El efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454 contra *Candida albicans* ATCC 10231 es de tipo fungistático.
3. El efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527 contra *Candida albicans* ATCC 10231 es de tipo fungistático.
4. El efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Candida albicans* ATCC 10231 es de tipo fungistático.
5. El efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Candida albicans* ATCC 10231 es de tipo fungistático.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Determinar el efecto inhibitorio de probióticos nativos sobre biofilm conformado por bacterias cariogénicas y *Candida albicans* en modelos de boca artificial.
2. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis* contra *Candida albicans* para convertirlo en efecto fungicida.
3. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527 contra *Candida albicans* para convertirlo en efecto fungicida.
4. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Candida albicans* para convertirlo en efecto fungicida.
5. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Candida albicans* para convertirlo en efecto fungicida.

## REFERENCIAS

1. Anuska R, Humar D, Basheer B, Baroudi K. The magic of magic bugs in oral cavity: Probiotics. *J Adv Pharm Technol Res* [Internet]. 2015 [citado 21 de abril de 2021]; 6 (2): 43–47. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/2231-4040.154526>.
2. Hu L, Zhou M, Young A, Zhao W, Yan Z. In vivo effectiveness and safety of probiotics on prophylaxis and treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health* [Internet]. 2019 [citado 21 de abril de 2021]; 19 (140): 1-12. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0841-2>.
3. Otero E, Peñamaria M, Rodriguez M, Martin B, Blanco A. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Avances en Odontoestomatología* [Internet]. 2015 [citado 21 Abr 2021]; 31 (3): 135-148 Disponible en: [doi.org/10.4321/S0213-12852015000300004](https://doi.org/10.4321/S0213-12852015000300004).
4. Ribeiro F, Rossoni R, de Barros P, Santos J, Fugisaki L, Leão M, et al. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. Department of Biosciences and Oral Diagnosis, Institute of Science and Technology [Internet]. 2019 [citado 21 Abr 2021]; 129 (1): 175-185. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/JAM.14511>.
5. Shenoy A, Gottlieb A. Probiotics for oral and vulvovaginal candidiasis: A review. *Dermatologic Therapy* [Internet]. 2019 [citado 21 Abr 2021]; 32 (4): 1-13. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/dth.12970>
6. Ruixue A, Jiao W, Danhua M, Lu J, Hongxia D, Yu Z, et al. A meta-analysis of randomized trials assessing the effects of probiotic preparations on oral candidiasis in the elderly. *Archives of Oral Biology* [Internet]. 2017 [citado 21 Abr 2021]; (83):187-192. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.030>.
7. Zurita S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* [Internet]. 2018 [citado 21 Abr 2021]; 35(1):125-131. Disponible en: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3563>
8. Enriquez S, Gomez G, Guerrero M. Efecto antifúngico in vitro de los extractos hidroetanólicos de *Prosopis pallida* (algarrobo), *Plantago major* (llantén), *Ruta*

- graveolens (ruda) sobre *Candida albicans* ATCC 10231[Tesis título]. Piura: Facultad de estomatología de la Universidad Cesar Vallejo; 2018. 102 p.
9. Azad A, Ranjbaran A, Zareshahrabadi Z, Mehrabani D, Zahed ZM, Talebanpour A, et al. Protective Effects of the Probiotic Bacterium *Streptococcus thermophilus* on *Candida albicans* Morphogenesis and a Murine Model of Oral Candidiasis. *Iran J Med Sci* [Internet]. 2021 [citado 21 Abr 2021]; 46 (3): 207–217. Disponible en: <https://doi.org/10.30476/ijms.2020.82080.0>
  10. Khalandi H, Masoori M, Farahyar S , Akbar A, Farzanegan A, Ghafour ET, et al. Antifungal Activity of Capric Acid, Nystatin, and Fluconazole and Their In Vitro Interactions Against *Candida* Isolates from Neonatal Oral Thrush. *Assay Drug Dev Technol* [Internet]. 2020 [citado 21 jun 2021]; 18(3): 1-7. Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/adt.2020.971>
  11. Salari S, Ghasemi A. Antifungal effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* against different oral *Candida* species isolated from HIV/ AIDS patients: an in vitro study. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2020 [citado 21 jun 2021]; 12(1):1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1769386>.
  12. Allonsius CN, Vandenheuvel D, Oerlemans EF, Petrova MI, Donders GG, Paul Cos P, et al. Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Sci Rep* [Internet]. 2019 [Citado 20 jun 2021]; 9, 2900. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39625-0>
  13. Mailänder-Sánchez D, Braunsdorf C, Grumaz C, Müller C, Lorenz S, Stevens P, Wagener J, et al. Antifungal defense of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG is mediated by blocking adhesion and nutrient depletion. *PLoS One*. [Internet] 2017 [Citado 20 jun 2021];12(10):1-19. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0184438>
  14. Camargo F, Pimentel P, Rossoni D, Campos J, Cardoso A. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2016 [ Citado 20 jun 2021]; 1(1): 201-211. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jam.13324>.
  15. James K, MacDonald K, Chanyi R, Cadieux P, Burton J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation and modulation of gene expression by probiotic cells

- and supernatant. *J Med Microbiol* [ Internet]. 2016 [citado 08 abril 2021]; 65 (1): 328–336. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000226>.
16. Coman M, Verdenelli M, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi M, Caspani F, et al. In vitro evaluation on HeLa cells of protective mechanisms of probiotic lactobacilli against *Candida* clinical isolates. *J Appl Microbiol* [ Internet]. 2015 [citado 08 abril 2021]; 119: 1-8. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jam.12947>
  17. World Health Organization [internet]. Perú: OMS 2020 [citado 20 Abr 2021] Disponible en: [https://www.who.int/topics/oral\\_health/es/](https://www.who.int/topics/oral_health/es/)
  18. Hechevarria B, Venzant S, Crabonell M, Crabonell C. Salud bucal en la adolescencia. *MEDISAN* [internet]. 2013 [ citado 20 Abr 2021];17(1): 117-125. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=368444989020>.
  19. Warren C, Thomson J, Wendong W, Arshad A, Mintao Z. The potential management of oral candidiasis using anti-biofilm therapies. *Medical Hypotheses* [ internet]. 2017 [ citado 20 Abr 2021];106 (1): 15-18. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2017.06.029>.
  20. Contreras A . La promoción de la Salud general y la Salud Oral: una estrategia conjunta. *Rev clín periodoncia implantol rehabil oral* [ internet]. 2016 [citado 20 Abr 2021]; 9(2): 193-202. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.piro.2016.07.003>.
  21. Lewis M, Williams D. Diagnosis and management of oral Candidosis. *BDJ Oral Medicine Themed Issue* [internet]. 2017 [citado 20 Abr 2021]; 223 (1): 675-681. Disponible en: <https://doi.org/10.1038 / sj.bdj.2017.886>.
  22. Hellstein J, Marek C . Candidiasis: Red and White manifestation in the Oral Cavity. *Head and Neck Pathology* [internet]. 2019 [citado 20 Abr 2021]; 13 (1) : 25-32. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01004-6>.
  23. Zangl I, Pap I , Aspöck C , Schuller C. The role of *Lactobacillus* species in the control of *Candida* via biotrophic interactions. *Microbial Cell* [internet]. 2020 [citado 19 Abr 2021]; 7(1): 1-14. Disponible en: <https://doi.org/10.15698/mic2020.01.702>.
  24. Baumgardner D. Oral Fungal Microbiota: To Thrush and Beyond. *Journal of Patient – Centered Research and Reviews* [internet]. 2019 [citado 20 Abr 2020]; 6(4): 252-261. Disponible en: <https://doi.org/10.17294/2330-0698.1705>.

25. Oshima T, Kojima Y, Sereviratne C, Maeda N. Therapeutic Application of Synbiotics, a Fusion of Probiotics and Prebiotics, and Biogenics as a New Concept for Oral Candida Infections: A Mini Review. *Front. Microbiol* [Internet]. 2016 [citado 18 abr 2021]; (7):1-10. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00010>.
26. Hasslof P, Stecksén-Blicks C. Probiotic Bacteria and Dental Caries. The Impact of Nutrition and Diet on Oral Health [internet]. 2020 [citado 19 Abr 2021]; 28 (1): 99-107. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000455377>.
27. Hu L, Zhou M, Young A, Zhao W, Yan Z. In vivo effectiveness and safety of probiotics on prophylaxis and treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health* [Internet]. 2019 [citado 18 abr de 2021]; 19(140): 1-12. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0841-2>.
28. Fierro-Monti C, Aguayo-Saldías C, Lillo-Climent F, Riveros-Figueroa F. Rol de los Probióticos como bacterioterapia en Odontología. Revisión de la literatura. *Odontoestomatología* [internet]. 2017 [citado 19 Abr 2021]; 1(1):4-17. Disponible en: <https://doi.org/10.22592/o2017n30a2>.
29. Wieers G, Belkhir L, Enaud R, Leclercq S, Dequenne I. Affect the Microbiota. *Frontiers in cellular and Infection Microbiology* [internet]. 2020 [citado 19 Abr 2021]; 9 (454): 1- 9. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00454>.
30. Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen J, Stuer-Lauridsen B. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. *Microorganisms* [internet]. 2014 [citado 21 Abr 2021]; 2(2):92-110. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms202009221>.
31. Song A, In L, Lim S, Rahim R. Una revisión sobre *Lactococcus lactis* : de la comida a la fábrica. *Microbial Cell Factories* [internet]. 2017 [citado 21 Abr 2021]; 16 (1): 1-15. Disponible en: <https://doi.org/10.1186 / s12934-017-0669-x>.
32. Guo Y, Pan D, Li H, Sun Y, Zeng X, Hua Li, et al. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Food Chemistry* [internet]. 2013 [citado 21 Abr 2021]; 138 (1): 84-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.029>.



33. Goldstein E, Kerin L, Tyrrell C. Lactobacillus Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibility, Clinical Infectious Diseases [Internet] 2015 [Citado 17 May del 2021]; 60(2):98-107. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/cid/civ072>
34. Fina J. Caracterización funcional de la proteína de capa S (S-layer) de Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 [Tesis Doctoral]. Buenos Aires:Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica, 2019. 182pp. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/80080>
35. Velasquez J, Giraldo G, Padilla L, Giraldo Y. Crecimiento De Lactobacillus casei ssp casei ATCC 393 en suero clarificado. Rev Bio Agro [Internet]. 2015 [citado 17 May 2021];13(1):19-27.Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1692-35612015000100003&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612015000100003&lng=en).
36. Manzano C, Estupiñan D, Poveda E. Efectos Clínicos de los probióticos: Que dice la evidencia. Revista Chilena de nutrición [internet]. 2012 [citado 20 Abr 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>.
37. Jungersen M, Wind A, Johansen E, Christensen J, Stuer-Lauridsen B, Eskesen D. The Science behind the Probiotic Strain Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 Microorganisms [Internet]. 2014 [ citado 21 Abr 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/microorganisms2020092>.
38. Song A, In L, Lim S, Rahim R. Una revisión sobre Lactococcus lactis: de la comida a la fábrica. Microbial Cell Factories [internet]. 2017 [ citado 21 Abr 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>.
39. Guo Y, Pan D, Li H, Sun Y, Zeng X, Yan B. Antioxidant and immunomodulatory activity of selenium exopolysaccharide produced by Lactococcus lactis subsp. lactis. Food Chemistry [internet]. 2013 [citado 21 Abr 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.029>.
40. Gamazo C, Sánchez S, Camacho A. Microbiología basada en la experimentación. España: Elsevier. 2013.
41. Mishra C, Lambert J. Production of anti-microbial substances by probiotics. Asia Pac J Clin Nutr [Internet]. 1996 [Citado 20 Jun 2021]; 5(1):20-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24394460/>

**ANEXO**

**ANEXO 1**

**MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICION
Cepas probióticas	Microorganismos vivos que, ingeridos en cantidad adecuada, ejercen efectos beneficiosos en la salud del receptor. <sup>38</sup>	Cepas probióticas certificadas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356, <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393 <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i> ATCC 25527 <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Concentración de <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356  Concentración de <i>L. casei</i> ATCC 393  Concentración de <i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> ATCC 25527  Concentración de <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454	1,5 x 10 <sup>9</sup> UFC/mL 1,5 x10 <sup>8</sup> UFC/mL <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356  1,5 x 10 <sup>9</sup> UFC/mL 1,5 x10 <sup>8</sup> UFC/mL <i>L. casei</i> ATCC 393  1 x 10 <sup>9</sup> UFC/mL 1 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL <i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> ATCC 25527  1 x 10 <sup>9</sup> UFC/mL 1 x 10 <sup>8</sup> UFC/mL <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Razón
Efecto in vitro contra <i>Candida albicans</i>	Cambios en el desarrollo de <i>Candida albicans</i> en un ambiente controlado en un laboratorio	Capacidad de producir cambios o no el desarrollo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en un medio de cultivo artificial de manera temporal (efecto fungistático) o permanente (efecto fungicida).	Efecto fungicida contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Efecto fungistático contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Sin efecto contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Método de Difusión en disco Halo de inhibición ≥ 15 mm Halo de inhibición ≤ 14 mm Halo de inhibición ≤ 6 mm	Razón



### ANEXO 3

#### CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

En la investigación no aplica el cálculo del tamaño de la muestra sino la determinación del número de unidades de ensayo (replicados). Para ello se aplicó la siguiente fórmula estadística que se usa en estudios experimentales para determinar el número de observaciones, duplicados y repeticiones:

$$n = \frac{W - W^2 \cdot Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha}^2}{W^2}$$

Donde:

n: Número mínimo de réplicas que deben hacerse en el estudio.

Z $\alpha$ : Valor correspondiente al nivel de confianza asignado.

Z $\beta$ : Valor correspondiente al valor estadístico.

W: Eficiencia mínima esperada o diferencia mínima observable.

Siendo, Z $\alpha$  = 1.96; Z $\beta$  = 0.842 y W = 0.80 (80%). Si reemplazamos los valores en la fórmula obtiene que el número de repeticiones necesarias son 9.

$$n = \frac{0.8 - (0.8)^2 \cdot (0.842) + 1,4 (1.96)^2}{(0.8)^2}$$

$$n = \frac{0.8 - (0.64) \cdot (0.842) + 1,4 (3.841)}{0.64}$$

$$n = 9$$

Las unidades de ensayo fueron 10 (1 ensayo original y 9 repeticiones) por cada ensayo que hace un total de 90 repeticiones.

## ANEXO 4

### TABLAS, FIGURAS Y FOTOS

Resumen de procesamiento de casos						
Concentración de probiótico	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
L. acidophilus 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. acidophilus 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. casei 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. casei 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. lactis 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. lactis 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
B. animalis 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
B. animalis 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
Nistatina 100000 UI/mL	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%

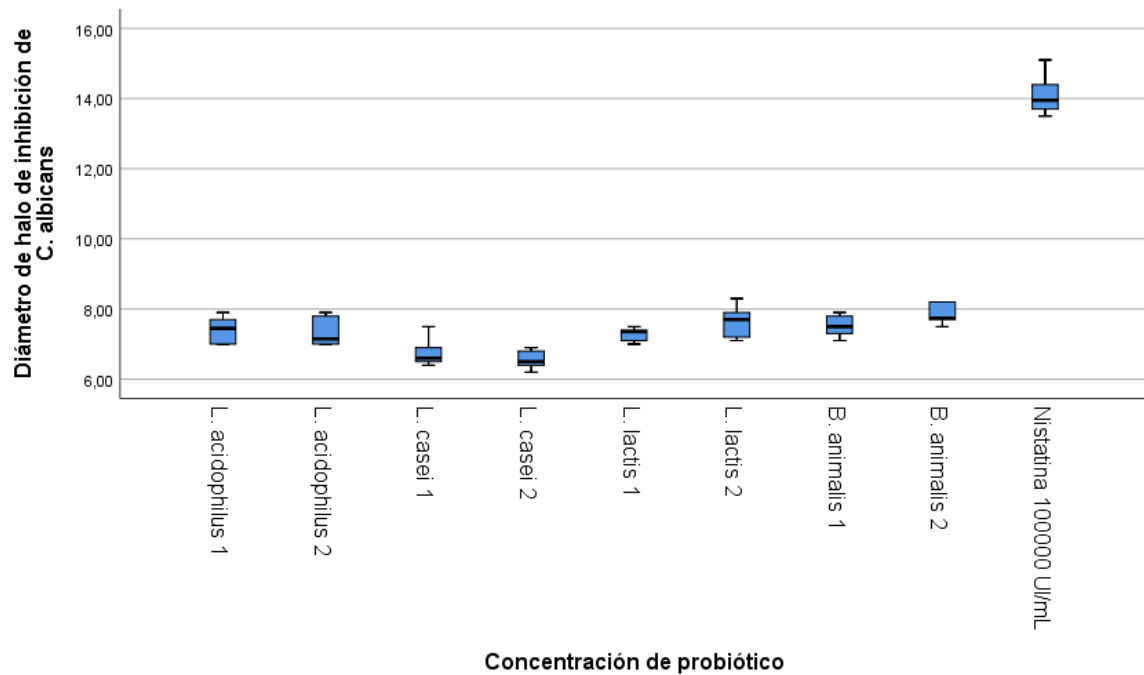
Descriptivos				
Concentración de probiótico			Estadístico	Error estándar
L. acidophilus 1	Media		7,4000	,10750
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	7,1568	
		Límite superior	7,6432	
	Media recortada al 5%		7,3944	
	Mediana		7,4500	
	Varianza		,116	
	Desviación estándar		,33993	
	Mínimo		7,00	
	Máximo		7,90	
	Rango		,90	
	Rango intercuartil		,72	
	Asimetría		,064	,687
	Curtosis		-1,482	1,334
L. acidophilus 2	Media		7,3400	,12490
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	7,0575	
		Límite superior	7,6225	
	Media recortada al 5%		7,3278	
	Mediana		7,1500	
	Varianza		,156	
	Desviación estándar		,39497	
	Mínimo		7,00	
	Máximo		7,90	
	Rango		,90	
	Rango intercuartil		,83	
	Asimetría		,629	,687
	Curtosis		-1,655	1,334
L. casei 1	Media		6,7500	,11377
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,4926	
		Límite superior	7,0074	
	Media recortada al 5%		6,7278	
	Mediana		6,6000	
Varianza		,129		

	Desviación estándar		,35978	
	Mínimo		6,40	
	Máximo		7,50	
	Rango		1,10	
	Rango intercuartil		,48	
	Asimetría		1,226	,687
	Curtosis		,722	1,334
L. casei 2	Media		6,5500	,07782
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,3740	
		Límite superior	6,7260	
	Media recortada al 5%		6,5500	
	Mediana		6,5000	
	Varianza		,061	
	Desviación estándar		,24608	
	Mínimo		6,20	
	Máximo		6,90	
	Rango		,70	
	Rango intercuartil		,45	
	Asimetría		-,112	,687
	Curtosis		-1,133	1,334
	L. lactis 1	Media		7,3000
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	7,1738	
		Límite superior	7,4262	
Media recortada al 5%			7,3056	
Mediana			7,3500	
Varianza			,031	
Desviación estándar			,17638	
Mínimo			7,00	
Máximo			7,50	
Rango			,50	
Rango intercuartil			,33	
Asimetría			-,607	,687
Curtosis			-1,002	1,334
L. lactis 2		Media		7,6500
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	7,3614	
		Límite superior	7,9386	
	Media recortada al 5%		7,6444	
	Mediana		7,7000	
	Varianza		,163	
	Desviación estándar		,40346	
	Mínimo		7,10	
	Máximo		8,30	
	Rango		1,20	
	Rango intercuartil		,75	
	Asimetría		,076	,687
	Curtosis		-1,057	1,334
	B. animalis 1	Media		7,5100
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	7,3092	
		Límite superior	7,7108	
Media recortada al 5%			7,5111	

	Mediana		7,5000	
	Varianza		,079	
	Desviación estándar		,28067	
	Mínimo		7,10	
	Máximo		7,90	
	Rango		,80	
	Rango intercuartil		,55	
	Asimetría		,212	,687
	Curtosis		-1,071	1,334
B. animalis 2	Media		7,8600	,09092
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	7,6543	
		Límite superior	8,0657	
	Media recortada al 5%		7,8611	
	Mediana		7,7500	
	Varianza		,083	
	Desviación estándar		,28752	
	Mínimo		7,50	
	Máximo		8,20	
	Rango		,70	
	Rango intercuartil		,55	
	Asimetría		,151	,687
Curtosis		-1,817	1,334	
Nistatina 100000 UI/mL	Media		14,0600	,15861
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	13,7012	
		Límite superior	14,4188	
	Media recortada al 5%		14,0333	
	Mediana		13,9500	
	Varianza		,252	
	Desviación estándar		,50155	
	Mínimo		13,50	
	Máximo		15,10	
	Rango		1,60	
	Rango intercuartil		,78	
	Asimetría		,916	,687
Curtosis		,627	1,334	

#### Prueba de Normalidad

Concentración de probiótico	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
L. acidophilus 1	,180	10	,200*	,905	10	,251
L. acidophilus 2	,239	10	,112	,784	10	,009
L. casei 1	,256	10	,061	,845	10	,050
L. casei 2	,181	10	,200*	,923	10	,383
L. lactis 1	,215	10	,200*	,889	10	,167
L. lactis 2	,168	10	,200*	,950	10	,663
B. animalis 1	,214	10	,200*	,922	10	,378
B. animalis 2	,211	10	,200*	,843	10	,049
Nistatina 100000 UI/mL	,148	10	,200*	,929	10	,436



### Unidireccional

<b>Descriptivos</b>								
Diámetro de halo de inhibición de <i>C. albicans</i>								
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
L. acidophilus 1	10	7,4000	,33993	,10750	7,1568	7,6432	7,00	7,90
L. acidophilus 2	10	7,3400	,39497	,12490	7,0575	7,6225	7,00	7,90
L. casei 1	10	6,7500	,35978	,11377	6,4926	7,0074	6,40	7,50
L. casei 2	10	6,5500	,24608	,07782	6,3740	6,7260	6,20	6,90
L. lactis 1	10	7,3000	,17638	,05578	7,1738	7,4262	7,00	7,50
L. lactis 2	10	7,6500	,40346	,12758	7,3614	7,9386	7,10	8,30
B. animalis 1	10	7,5100	,28067	,08876	7,3092	7,7108	7,10	7,90
B. animalis 2	10	7,8600	,28752	,09092	7,6543	8,0657	7,50	8,20
Nistatina 100000 UI/mL	10	14,0600	,50155	,15861	13,7012	14,4188	13,50	15,10
Total	90	8,0467	2,19802	,23169	7,5863	8,5070	6,20	15,10

<b>Prueba de homogeneidad de varianzas</b>				
Diámetro de halo de inhibición de <i>C. albicans</i>	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	2,008	8	81	,056
Se basa en la mediana	1,182	8	81	,320
Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,182	8	58,966	,325
Se basa en la media recortada	1,872	8	81	,076

<b>ANOVA</b>					
Diámetro de halo de inhibición de <i>C. albicans</i>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	420,368	8	52,546	442,619	,000
Dentro de grupos	9,616	81	,119		
Total	429,984	89			



## Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición de <i>C. albicans</i>							
	(I) Concentración de probiótico	(J) Concentración de probiótico	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	L. acidophilus 1	L. acidophilus 2	,06000	,15409	1,000	-,4311	,5511
		L. casei 1	,65000*	,15409	,002	,1589	1,1411
		L. casei 2	,85000*	,15409	,000	,3589	1,3411
		L. lactis 1	,10000	,15409	,999	-,3911	,5911
		L. lactis 2	-,25000	,15409	,790	-,7411	,2411
		B. animalis 1	-,11000	,15409	,998	-,6011	,3811
		B. animalis 2	-,46000	,15409	,084	-,9511	,0311
		Nistatina 100000 UI/mL	-6,66000*	,15409	,000	-7,1511	-6,1689
	L. acidophilus 2	L. acidophilus 1	-,06000	,15409	1,000	-,5511	,4311
		L. casei 1	,59000*	,15409	,007	,0989	1,0811
		L. casei 2	,79000*	,15409	,000	,2989	1,2811
		L. lactis 1	,04000	,15409	1,000	-,4511	,5311
		L. lactis 2	-,31000	,15409	,540	-,8011	,1811
		B. animalis 1	-,17000	,15409	,972	-,6611	,3211
		B. animalis 2	-,52000*	,15409	,030	-1,0111	-,0289
		Nistatina 100000 UI/mL	-6,72000*	,15409	,000	-7,2111	-6,2289
	L. casei 1	L. acidophilus 1	-,65000*	,15409	,002	-1,1411	-,1589
		L. acidophilus 2	-,59000*	,15409	,007	-1,0811	-,0989
		L. casei 2	,20000	,15409	,929	-,2911	,6911
		L. lactis 1	-,55000*	,15409	,017	-1,0411	-,0589
		L. lactis 2	-,90000*	,15409	,000	-1,3911	-,4089
		B. animalis 1	-,76000*	,15409	,000	-1,2511	-,2689
		B. animalis 2	-1,11000*	,15409	,000	-1,6011	-,6189
		Nistatina 100000 UI/mL	-7,31000*	,15409	,000	-7,8011	-6,8189
	L. casei 2	L. acidophilus 1	-,85000*	,15409	,000	-1,3411	-,3589
		L. acidophilus 2	-,79000*	,15409	,000	-1,2811	-,2989
		L. casei 1	-,20000	,15409	,929	-,6911	,2911
		L. lactis 1	-,75000*	,15409	,000	-1,2411	-,2589
		L. lactis 2	-1,10000*	,15409	,000	-1,5911	-,6089
		B. animalis 1	-,96000*	,15409	,000	-1,4511	-,4689
		B. animalis 2	-1,31000*	,15409	,000	-1,8011	-,8189
		Nistatina 100000 UI/mL	-7,51000*	,15409	,000	-8,0011	-7,0189
	L. lactis 1	L. acidophilus 1	-,10000	,15409	,999	-,5911	,3911
		L. acidophilus 2	-,04000	,15409	1,000	-,5311	,4511
		L. casei 1	,55000*	,15409	,017	,0589	1,0411
		L. casei 2	,75000*	,15409	,000	,2589	1,2411
		L. lactis 2	-,35000	,15409	,371	-,8411	,1411
		B. animalis 1	-,21000	,15409	,908	-,7011	,2811
		B. animalis 2	-,56000*	,15409	,014	-1,0511	-,0689
		Nistatina 100000 UI/mL	-6,76000*	,15409	,000	-7,2511	-6,2689
	L. lactis 2	L. acidophilus 1	,25000	,15409	,790	-,2411	,7411
		L. acidophilus 2	,31000	,15409	,540	-,1811	,8011
L. casei 1		,90000*	,15409	,000	,4089	1,3911	
L. casei 2		1,10000*	,15409	,000	,6089	1,5911	
L. lactis 1		,35000	,15409	,371	-,1411	,8411	
B. animalis 1		,14000	,15409	,992	-,3511	,6311	
B. animalis 2		-,21000	,15409	,908	-,7011	,2811	
Nistatina 100000 UI/mL		-6,41000*	,15409	,000	-6,9011	-5,9189	
B. animalis 1	L. acidophilus 1	,11000	,15409	,998	-,3811	,6011	

		L. acidophilus 2	,17000	,15409	,972	-,3211	,6611
		L. casei 1	,76000*	,15409	,000	,2689	1,2511
		L. casei 2	,96000*	,15409	,000	,4689	1,4511
		L. lactis 1	,21000	,15409	,908	-,2811	,7011
		L. lactis 2	-,14000	,15409	,992	-,6311	,3511
		B. animalis 2	-,35000	,15409	,371	-,8411	,1411
		Nistatina 100000 UI/mL	-6,55000*	,15409	,000	-7,0411	-6,0589
	B. animalis 2	L. acidophilus 1	,46000	,15409	,084	-,0311	,9511
		L. acidophilus 2	,52000*	,15409	,030	,0289	1,0111
		L. casei 1	1,11000*	,15409	,000	,6189	1,6011
		L. casei 2	1,31000*	,15409	,000	,8189	1,8011
		L. lactis 1	,56000*	,15409	,014	,0689	1,0511
		L. lactis 2	,21000	,15409	,908	-,2811	,7011
		B. animalis 1	,35000	,15409	,371	-,1411	,8411
		Nistatina 100000 UI/mL	-6,20000*	,15409	,000	-6,6911	-5,7089
	Nistatina 100000 UI/mL	L. acidophilus 1	6,66000*	,15409	,000	6,1689	7,1511
		L. acidophilus 2	6,72000*	,15409	,000	6,2289	7,2111
		L. casei 1	7,31000*	,15409	,000	6,8189	7,8011
		L. casei 2	7,51000*	,15409	,000	7,0189	8,0011
		L. lactis 1	6,76000*	,15409	,000	6,2689	7,2511
		L. lactis 2	6,41000*	,15409	,000	5,9189	6,9011
		B. animalis 1	6,55000*	,15409	,000	6,0589	7,0411
		B. animalis 2	6,20000*	,15409	,000	5,7089	6,6911

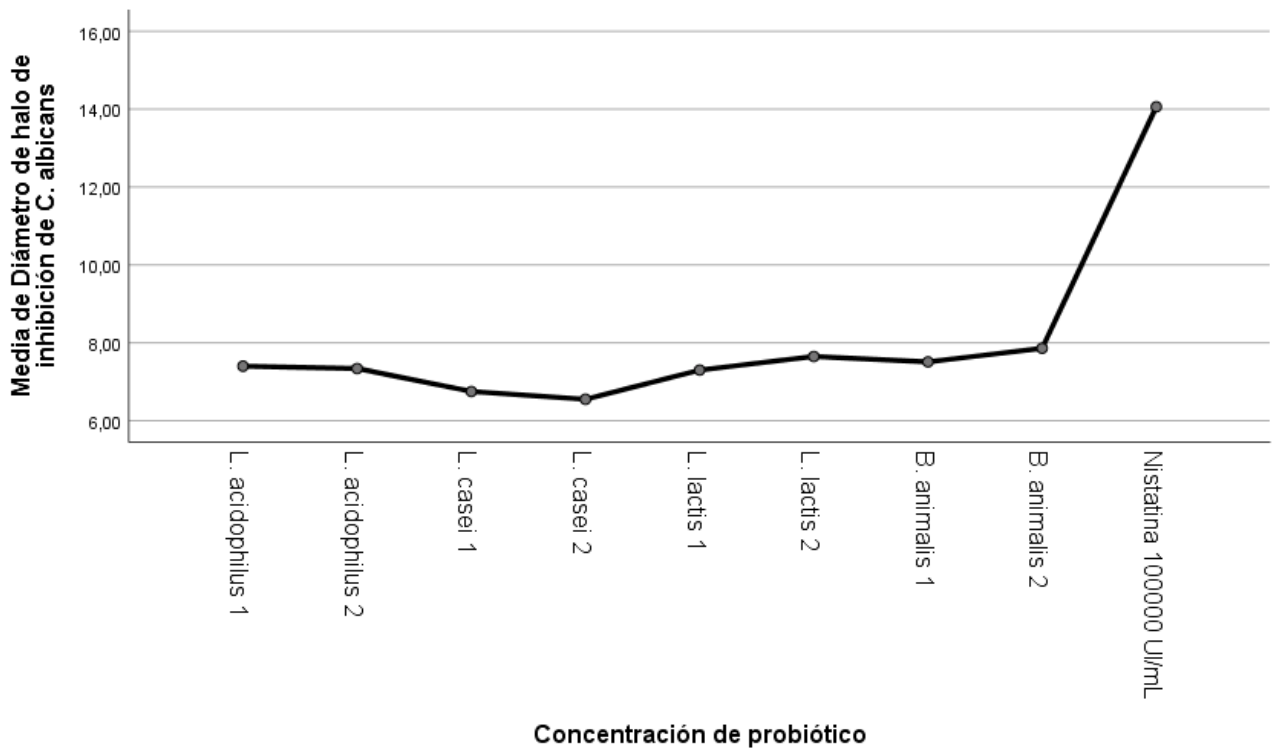
\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## Subconjuntos homogéneos

Diámetro de halo de inhibición de <i>C. albicans</i>							
	Concentración de probiótico	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
			1	2	3	4	5
HSD Tukey <sup>a</sup>	L. casei 2	10	6,5500				
	L. casei 1	10	6,7500				
	L. lactis 1	10		7,3000			
	L. acidophilus 2	10		7,3400			
	L. acidophilus 1	10		7,4000	7,4000		
	B. animalis 1	10		7,5100	7,5100		
	L. lactis 2	10		7,6500	7,6500		
	B. animalis 2	10			7,8600		
	Nistatina 100000 UI/mL	10				14,0600	
	Sig.		,929	,371	,084	1,000	
Duncan <sup>a</sup>	L. casei 2	10	6,5500				
	L. casei 1	10	6,7500				
	L. lactis 1	10		7,3000			
	L. acidophilus 2	10		7,3400	7,3400		
	L. acidophilus 1	10		7,4000	7,4000		
	B. animalis 1	10		7,5100	7,5100		
	L. lactis 2	10			7,6500	7,6500	
	B. animalis 2	10				7,8600	
	Nistatina 100000 UI/mL	10					14,0600
	Sig.		,198	,220	,069	,177	1,000

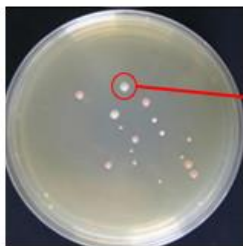
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

## Gráficos de medias



## TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

**MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO:** Para estandarización de los inóculos microbianos.



UFC en cultivo



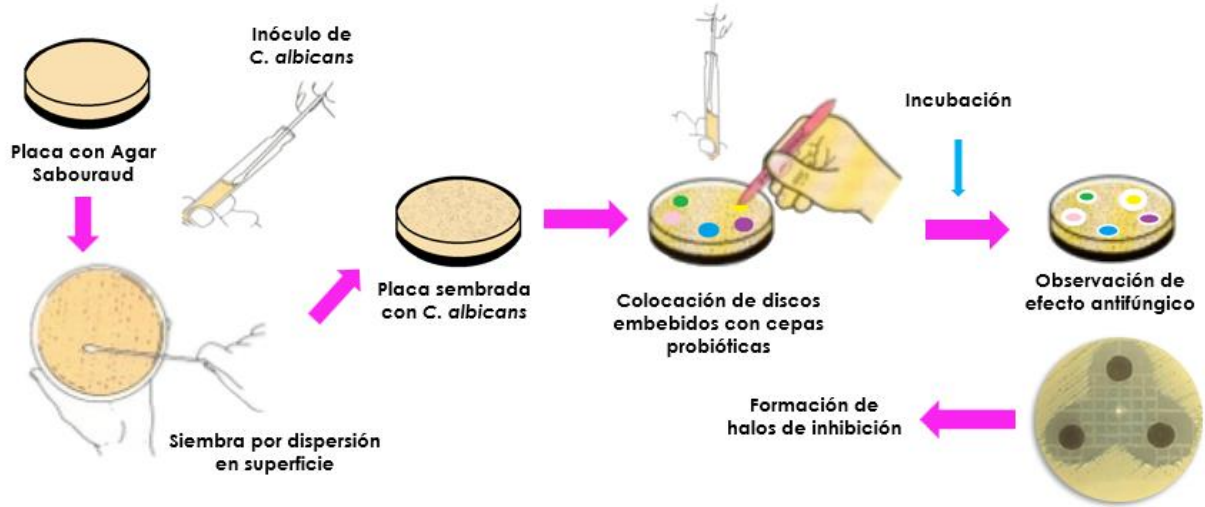
Suspensión microbiana



Espectrofotómetro  
Marca: KynTel  
Modelo: VIS-KV-1200

# TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

## EFFECTO IN VITRO: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO



## PROCEDIMIENTOS:

Cepas microbianas adquirieron de GenLab del Perú S.A.C.

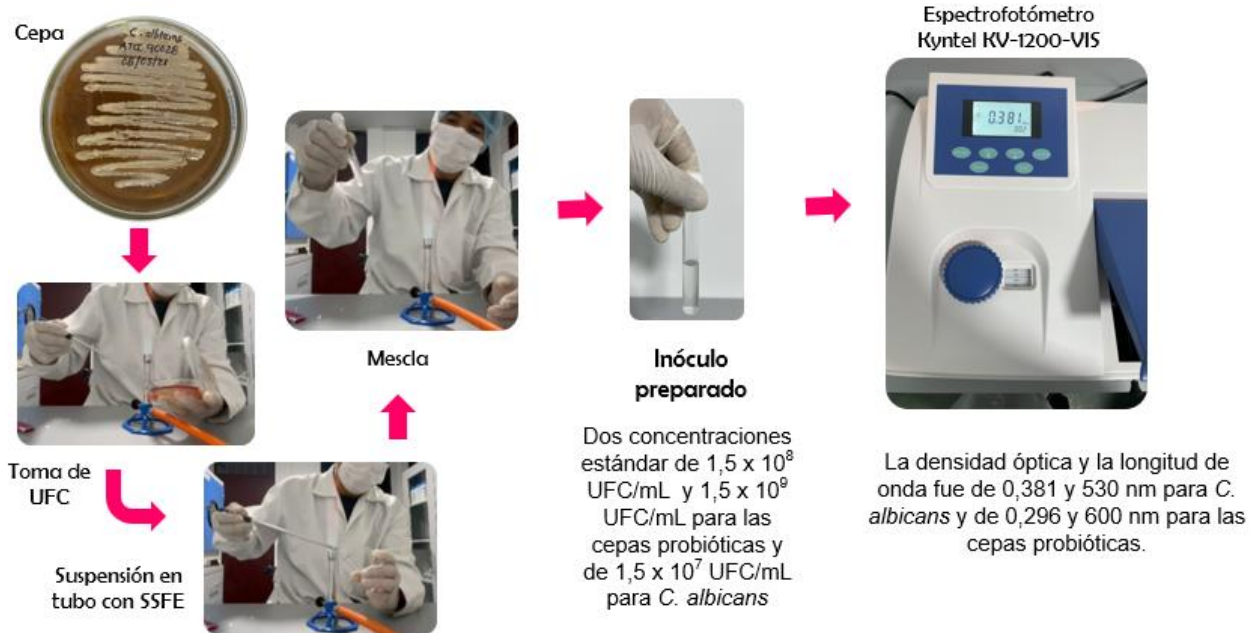
Medios de cultivo



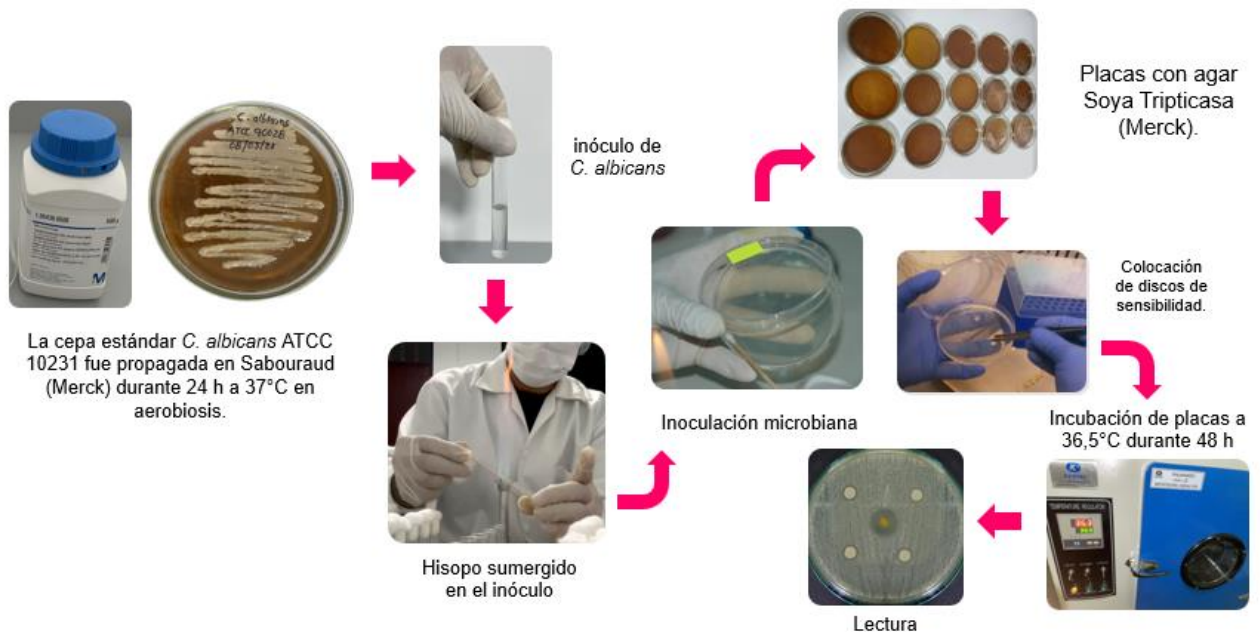
Reactivación de cepas de *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 393 y de *C. albicans*



## Preparación y estandarización del inóculo microbiano



## Prueba de susceptibilidad de *Candida albicans*





**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA**

### **Declaratoria de Autenticidad del Asesor**

Yo, RUIZ BARRUETO MIGUEL ANGEL, docente de la FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la escuela profesional de ESTOMATOLOGÍA de la UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO SAC - PIURA, asesor de Tesis titulada: "EFECTO IN VITRO DE CEPAS PROBIÓTICAS CONTRA CANDIDA ALBICANS ATCC 10231", cuyos autores son ÑIQUEN CORNEJO NIKOL GERALDINE, LEON VELEZ NOELIA SAMANTHA, constato que la investigación cumple con el índice de similitud establecido, y verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin, el cual ha sido realizado sin filtros, ni exclusiones.

He revisado dicho reporte y concluyo que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la Tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

En tal sentido, asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

PIURA, 22 de Julio del 2021

<b>Apellidos y Nombres del Asesor:</b>	<b>Firma</b>
RUIZ BARRUETO MIGUEL ANGEL <b>DNI:</b> 42814146 <b>ORCID</b> 0000-0002-3373-4671	Firmado digitalmente por: MARUIZB el 22-07-2021 07:19:43

Código documento Trilce: TRI - 0141883