

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL
Artemisia absinthium L. (Ajenjo) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) EN
CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175”**

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS:

Bach: Cáceres Vicencio Ruth Roxana

Bach: Ramírez Illesca Deysi Victoria

ASESORA:

Magister Q.F. Martínez Cortez Ysabel

**LIMA – PERÚ
2019**

**“EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL
Artemisia absinthium L. (Ajenjo) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) EN
CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175”**

Dedicatoria

A mi mamá por ser el sostén incondicional siempre, apoyándome y guiándome a la dirección correcta, a Dios por la fuerza que me brinda en el proceso de titulación.

Bachiller Roxana Cáceres

A mis padres Lenin y Victoria por su confianza, lealtad y apoyo en los buenos y malos momentos, a mis hermanos por ser ejemplo de lucha y perseverancia para alcanzar mis objetivos y ser la persona ideal que siempre quise ser.

Bachiller Deysi Ramírez

Agradecimiento

A todas las personas que, con sus recursos científicos y humanos, colaboraron en la realización de este trabajo de investigación y consolidaron la base de nuestro conocimiento.

A nuestras familias que, siempre están para nosotras apoyándonos e incentivándonos a ser mejores personas cada día.

A Dios, por la fortaleza que nos brinda para lograr con perseverancia y sacrificio una de nuestras metas.

Bachiller Roxana Cáceres y Deysi Ramirez

Índice General

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice general	
Índice de tablas	
Índice de figuras	
Índice de anexos	
Resumen	
Abstract	
Introducción	
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Formulación del problema.....	5
1.2.1 Problema general.....	5
1.2.2 Problemas específicos.....	5
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
1.4 Justificación e importancia del estudio.....	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1 Antecedentes del estudio.....	9
2.1.1 Nacionales	9
2.1.2 Internacionales.....	13
2.2. Bases teóricas	16
2.2.1 <i>Artemisia Absinthium</i> L. (Ajenjo)	16
2.2.2 <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	19
2.2.3 Extractos	23
2.2.4 <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	23

2.3. Formulación de la Hipótesis.....	27
2.3.1 Hipótesis general	27
2.3.2 Hipótesis específica	27
2.4. Variables.....	27
2.4.1 Tabla de Operacionalización de Variables.....	27
2.5. Marco conceptual	28
CAPITULO III: MÉTODO	30
3.1. Tipo del estudio.....	30
3.2. Diseño a utilizar	30
3.3. Población	31
3.4. Muestras	31
3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	31
3.5.1 Técnica de recolección de datos.....	31
3.5.2 Instrumentos de recolección de datos.....	32
3.5.3 Delimitación de la muestra	32
3.5.4 Equipos, reactivos y materiales.....	33
3.5.5 Parte experimental	35
3.5.6 Marcha Fitoquímica.....	36
3.5.7 Método de difusión en placa o método de Kirby Bauer.....	37
3.6. Procedimiento experimental.....	38
3.6.1 Recolección de las plantas e identificación botánica	38
3.6.2 Preparación del material vegetal.....	39
3.6.3 Obtención del extracto etanólico	40
3.6.4 Marcha Fitoquímica de <i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero).....	43
3.6.5 Prueba de solubilidad del extracto etanólico del <i>Artemisia</i> <i>absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	47
3.6.6 Procedimiento del Análisis Microbiológico	47
3.7. Técnica de Procesamiento de datos.....	55
CAPITULO IV: RESULTADOS	56

4.1. Resultados de la investigación	56
4.1.1. Marcha Fitoquímica	56
4.1.2. Prueba de Solubilidad	58
4.1.3 Resultados del Análisis Microbiológico	59
4.2 Discusión de resultados	72
CAPÍTULO V:CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
5.1. Conclusiones	76
5.2. Recomendaciones	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
ANEXOS	83

Índice de Tablas

Tabla 1. Operalización de Variables e Indicadores	27
Tabla 2. Resumen de resultados juicio de expertos	32
Tabla 3. Equipos	33
Tabla 4. Reactivos.....	34
Tabla 5. Materiales.....	34
Tabla 6. Medio de cultivo.....	35
Tabla 7. Reactivos utilizados en la prueba de coloración.....	45
Tabla 8. Cronograma del tiempo de activación de la cepa.....	54
Tabla 9. Resultados del Análisis fitoquímico <i>Artemisia absinthium</i> L. “Ajenjo”. 56	
Tabla 10. Resultados del Análisis fitoquímico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. “Romero”.	57
Tabla 11. Resultados de prueba de solubilidad de <i>Artemisia absinthium</i> L. “Ajenjo”.	58
Tabla 12. Resultados de prueba de solubilidad <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. “Romero”.	58
Tabla 13. Resultados del ensayo antibacteriano del extracto etanólico de <i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) frente a cepas <i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> ATCC 25175.	59
Tabla 14. Datos estadísticos descriptivos según los grupos experimentales: <i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo)	60
Tabla 15. Pruebas de normalidad	60
Tabla 16. Estadísticos de prueba A y B.....	61
Tabla 17. Comparaciones múltiples	61
Tabla 18. Comparaciones múltiples	62
Tabla 19 Resultados del ensayo antibacteriano del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) frente a cepas <i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> ATCC 25175.	63
Tabla 20. Datos estadísticos descriptivos según los grupos experimentales: Romero.....	64

Tabla 21. Pruebas de normalidad	64
Tabla 22. Estadísticas de prueba a b	65
Tabla 23. Comparaciones múltiples:	65
Tabla 24. Comparaciones múltiples:	66
Tabla 25. Comparaciones múltiples por el test de Dunnett entre los extractos de <i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) frente a cepas <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. Comparación entre los grupos experimentales contra el control negativo.....	67
Tabla 26. Comparaciones múltiples por el test de Dunnett entre los extractos de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) frente a cepas <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. Comparación entre los grupos experimentales contra el control negativo.	68
Tabla 27 Comparaciones múltiples <i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) con Ciprofloxacino.....	70
Tabla 28. Comparaciones múltiples <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) con Ciprofloxacino.....	71

Índice de Figuras

<i>Figura 1.</i> Vista general de <i>Arthemisia Absinthium</i> L. “Ajenjo”	16
<i>Figura 2.</i> Vista general de <i>Rosmarinus officinalis</i> L “Romero”	20
<i>Figura 3.</i> Vista general de la cepa de “ <i>Streptococcus mutans</i> ”	24
<i>Figura 4.</i> Distrito de San Mateo de Huanchor	38
<i>Figura 5.</i> Recolección de las plantas.....	39
<i>Figura 6.</i> Selección y limpieza.....	39
<i>Figura 7.</i> Secado de las plantas	40
<i>Figura 8.</i> Filtrado de la maceración	41
<i>Figura 9.</i> Destilación al vacío de la maceración	41
<i>Figura 10.</i> Flujograma del tratamiento a las muestras solidas de <i>Arthemisia absinthium</i> L. “Ajenjo” y <i>Rosmarinus officinalis</i> L.”Romero”.	42
<i>Figura 11.</i> Reactivos utilizados.....	45
<i>Figura 12.</i> Resultado de la marcha fitoquímica	46
<i>Figura 13.</i> Prueba de solubilidad.....	47
<i>Figura 14.</i> Fase Pre- analítica del tratamiento microbiológico en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	52
<i>Figura 15.</i> Fase Analítica del tratamiento microbiológico en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	53
<i>Figura 16.</i> Fase Post analítica del tratamiento microbiológico en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	54
<i>Figura 17.</i> Comparación de los diferentes grupos experimentales:“Ajenjo”.	62
<i>Figura 18.</i> Comparación de los diferentes grupos experimentales: “Romero”	66

Índice de Anexos

Anexo 1. Matriz de Consistencia.....	84
Anexo 2. Constancia de participación en el proceso microbiológico.....	85
Anexo 3. Constancia de clasificación taxonómica de las plantas.....	86
Anexo 4. Marcha Fitoquímica.....	87
Anexo 5. Procedimiento microbiológico	91
Anexo 6. Resultados microbiológicos obtenidos de análisis de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	94
Anexo 7. Resultados microbiológicos obtenidos de análisis de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	96
Anexo 8. Resultados microbiológicos obtenidos de análisis de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	98
Anexo 9. Ficha de recolección de datos, procedimiento microbiológico	99
Anexo 10. Ficha de recolección de datos, marcha fitoquímica.....	95
Anexo 11. Ficha de prueba de solubilidad	96
Anexo 12. Validación de instrumento de investigación	97
Anexo 13. Certificado de la cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	103

Resumen

Se elaboró el actual estudio a fin de establecer el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con una investigación tipo experimental, transversal, in vitro. La elaboración del extracto se hizo mediante el proceso de maceración etanólica, se reconocieron los metabolitos secundarios mediante la Marcha Fitoquímica y el efecto antimicrobiano se determinó a través del proceso microbiológico de difusión en placa. Las concentraciones de ambos extractos fueron de 100%, 75%, 50% y 25 % administrados de forma comparativa sobre las placas inoculadas con la bacteria mencionada. Como resultados se hallaron metabolitos secundarios de extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que probablemente generen actividad antibacteriana, in vitro, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 tales como los flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, taninos y saponinas. Como resultados microbiológicos se evidencio un efecto antibacteriano significativo del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) al 75 % y 100 % en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 usando como control al Ciprofloxacino. Se concluyo que ambas plantas no tuvieron similar efecto antibacteriano al Ciprofloxacino.

Palabras clave: Extracto, Romero, Ajenjo, antibacteriano

Abstract

The current study was prepared in order to establish the antibacterial effect of the ethanolic extract of *Artemisia absinthium* L. (Wormwood) and *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) against the strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175. With an experimental, transversal, in vitro type investigation. The preparation of the extract was done through the process of ethanolic maceration, secondary metabolites were established through Phytochemical March and the antimicrobial effect through the microbiological plate diffusion process. The concentrations of both extracts were 100%, 75%, 50% and 25% administered comparatively on the plates inoculated with the bacteria mentioned. As results, secondary metabolites of ethanolic extract of *Artemisia absinthium* L. (Wormwood) and *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) that probably generate antibacterial activity, in vitro, in strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 such as flavonoids, alkaloids, phenolic compounds, tannins and saponins. As microbiological results a significant antibacterial effect of the ethanolic extract of *Artemisia absinthium* L. (Wormwood) and *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) of 75% and 100% against the strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was demonstrated. In conclusion, both plants had no similar effect Ciprofloxacin antibacterial.

Keywords: Extract, Romero, Wormwood, antibacterial

Introducción

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) ante las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Dicho estudio está orientado a dar a conocer y resaltar los atributos curativos de ambas plantas como una buena alternativa para la salud.

Estudios realizados en nuestro país han permitido establecer el efecto antibacteriano in vitro de plantas en diversos microorganismos como *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans* causantes de diversas patologías infecciosas en adultos, ancianos y niños ⁽¹⁾.

Es conocido que los metabolitos activos extraídos de las plantas poseen acciones biológicas importantes y de cuantiosos beneficios saludables, por ejemplo, los polifenoles son de gran aporte para su reconocimiento estos son componentes fitoquímicos que abundan en los vegetales ⁽²⁾.

En la actualidad existen muchos datos de investigación en general y del uso de la medicina alternativa están muy extendido y de mayor importancia representa una biodiversidad teniendo el título de la mayor riqueza de la gran variedad en la flora ⁽³⁾. Las regiones de nuestro país son zonas favorables para la biodiversidad de plantas aun no estudiadas y otras que han demostrado efectos benéficos para la salud solas o en sinergismo con otras especies.

Dada la presencia de diversas bacterias patógenas que perjudican la salud del ser humano y son causantes de infinitas enfermedades llega a ser muy importante saber y reconocer cual es la especie causal y cómo actúa en cada uno del organismo, pero más significativo es la respuesta inmunológica y la activación de anticuerpos ante el ataque bacteriano ⁽⁴⁾.

Tomando en cuenta la problemática de las infecciones bacterianas se medirá el efecto antibacteriano de las especies planteando el siguiente problema: ¿Cuál será el efecto antibacteriano que posee el extracto etanólico de *Artemisia*

absinthium L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a las cepas de *Streptococcus mutans*?

Esta acción es demostrada mediante la especificación de las concentraciones óptimas del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que genere efecto antibacteriano, in vitro, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Por ello, el estudio posee esta distribución: El Capítulo I se plantea y formula el problema del estudio. El Capítulo II se investigaron los antecedentes que sustentorios de la investigación, diversas investigaciones relacionadas al estudio de las planta y especies con actividades terapeuticas similares y ademas se definen los términos correspondientes a la investigación asi como las bases teoricas de acuerdo a las variables establecidas. El Capítulo III se detallo la metodología de la investigación, se explicó la recolección de la planta, el tipo de investigación, instrumentos de recolección de datos, el procesamiento y análisis de datos estadísticos, que ayudo a distribuir la tecnica e instrumentos usados para realizar el estudio experiemal de ambas variables. El Capítulo IV se planteo el analisis de los resultados, aprobando las hipótesis y definiendo los resultados que ayudaron a definir y graficar los resultados encontrados. El Capítulo V las conclusiones y recomendaciones según el analisis estadístico realizado donde se realizo la comprobación de hipotesis planteada.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

El Ministerio de Salud manifiesta que las afecciones bacterianas son un dilema a nivel de salud pública nacional y extranjero, ello debido al aumento de la mortalidad y el incremento de los costos hospitalarios y en medicamentos para los tratamientos respectivos ⁽¹⁾. Las bacterias son microorganismos vivos responsables de numerosas enfermedades e infecciones que están causando muchos problemas socioeconómicos en la salud de la población ⁽¹⁾.

El consumo de antibióticos en las últimas 5 décadas creó un clima idóneo a las bacterias resistentes a los efectos tóxicos de los antimicrobianos ⁽⁵⁾.

La contaminación microbiológica es hoy en día riesgosa para la salud. El mundo se encuentra enfocado en una “era post-antibióticos” en donde diversas infecciones ordinarias y heridas leves regresarán se convertirán nuevamente en mortales ⁽⁶⁾ y a los conservantes sintéticos usados en empresas de alimentos, que en múltiples informes se consideran culpables de provocar cáncer y ser teratogénicos por su nivel de toxicidad. Debido a ello se incrementó el uso de preservantes naturales, constituyendo una posibilidad de fuente de sustancias con actividad antimicrobiana ⁽⁷⁾.

De las enfermedades infecciosas que perjudican al hombre, la caries dental es posiblemente la de mayor prevalencia. Conceptos actuales observan que muchos microorganismos están incluidos en la patogénesis de la caries dental (*Streptococcus del grupo mutans*, *Lactobacillus* spp y *Actinomyces* spp) de los cuales *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es el agente mayor importancia que se asocia a las caries ⁽⁸⁾.

Debido a que ante un agente antimicrobiano los organismos oponen resistencia bacteriana, los procesos microbiológicos tienen que redefinirse para obtener una mejor performance de los efectos que se obtienen y serán usados como tratamientos antibacterianos. La ciencia y la droga cambian en forma constante, por ello estándares y métodos sensatos se implementan juntamente con criterios clínico y exámenes similares que ayuden a dirigir los tratamientos que necesitan los pacientes ⁽⁹⁾.

La exploración de conocimientos nuevos acerca de la acción antimicrobiana de las plantas en el área farmacéutica y alimentaria despertó la atención para evaluar las propiedades que posee la *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) , planta nativa peruana del mundo antiguo la cual se distribuye en las tres regiones (costa, sierra y selva) y es usada en forma tradicional para combatir enfermedades gástricas (cólico, diarrea, disentería, gases, gastritis, indigestión, parásitos); el aceite del ajenjo es carminativo, espasmolítico, antibacteriana y antifúngico y del *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) se usa dentro del ámbito Fitoterapéutico. ⁽¹⁰⁾

De acuerdo con la realidad problemática planteada anteriormente nos motiva a hallar nuevos tratamientos por medio del uso de métodos de investigación en las plantas y establecer sus alcances curativos para combatir las enfermedades bacterianas que afectan a la humanidad las cuales al no curarse a tiempo producen complicaciones en la salud hasta llegar a morir.

El objetivo de la presente estudio es determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico del *Arthemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, y de esa forma dar una opción terapéutica a la población que no tiene llegada a la salud convencional o utilizarlo como un tratamiento complementario al uso de antibióticos sintéticos para así evitar la reaparición de dichas infecciones con la

ventaja que los productos naturales no presentan ningún riesgo de efectos adversos o reacciones medicamentosas.

1.2. Formulación del problema

1.2.1 Problema general

- ¿El extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) posee efecto antibacteriano frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Existe metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)?
2. ¿Existirá una concentración óptima del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que genere efecto antibacteriano, in vitro, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?
3. ¿Existe efecto antimicrobiano del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con el Ciprofloxacino en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar si existen metabolitos secundarios de extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).
2. Comprobar si existe una concentración óptima del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que genere efecto antibacteriano, in vitro, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.¿
3. Determinar si existe el efecto antimicrobiano del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con el Ciprofloxacino en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.4 Justificación e importancia del estudio

El estudio tiene valor teórico y social, debido que brinda el conocimiento científico acerca de la presencia de las plantas curativas que poseen cualidades antibacterianas, las mismas que pueden servir de opción para prevenir y tratar diversas enfermedades.

Por ello pueden conseguirse fármacos naturales cuya composición poseen compuestos químicos naturales de estas plantas, debido a las virtudes de la medicina tradicional, ocasionando de esa forma una serie de productos farmacéuticos naturales propios de la biodiversidad de nuestro país, los cuales poseen actividad antibacteriana. Al alcance de las poblaciones de bajos recursos económicos, dando una opción al problema de resistencia bacteriana a diversas patologías entre ellas la caries dental.

La OMS destaca el aumento de rechazo a los antibióticos mundialmente en cantidades alarmantes, diariamente aparece en forma gradual en todo el mundo, con nuevos mecanismos de

resistencia que impiden cada vez más la capacidad de poder curar enfermedades con infecciones simples ⁽⁶⁾.

La importancia de estar saludable es tomar en cuenta la buena alimentación e higiene personal así se podrían prevenir muchas enfermedades, causado por bacterias y diferentes tipos de infecciones evitando así el incremento de enfermedades patológicas que causan mucho daño aumentando así el nivel de porcentaje de morbilidad y mortalidad ⁽¹⁾.

Estudios realizados sobre los efectos antimicrobianos de extractos y aceites esenciales de plantas oriundas fueron expuestos en varias naciones, tales como Brasil, Cuba, India, México y Jordania, las cuales poseen amplia gama floral y vasta costumbre en la utilización de hierbas curativas. Ya que tienen una variedad de sustancias con propiedades antimicrobianas. Sin embargo, estudios científicos que brindaron conocimiento acerca del potencial terapéutico de dichas plantas tienen limitaciones y se cuenta con escasas investigaciones científicas que ratifican la experimentación a probables propiedades antibióticas de varias de estas plantas ⁽¹¹⁾.

En la actualidad, la aparición de microorganismos patógenos que generan gran diversidad de patologías y en muchos casos crea resistencia a fármacos antibacterianos indicados para el tipo de infección y con el incremento de la dosis nos puede llevar a graves problemas vinculados con los fármacos.

Ante este problema se realizó un estudio experimental demostrando que el extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) presenta efecto antimicrobiano, in vitro, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

La presente investigación tiene justificación teórica y experimental puesto que la discusión de resultados contribuye en el conocimiento

actual sobre las reacciones medicinales de la mencionada planta. Además, se compara en diversas concentraciones de extracto que justifican su efecto antimicrobiano. Por lo tanto, es necesario saber las propiedades curativas de las plantas y con escaso conocimiento de los efectos antimicrobianos sobre microorganismos de *Streptococcus mutans* causantes de diferentes enfermedades, se afirma la importancia de realizar la presente investigación a favor de la ciudadanía y la comunidad científica.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

2.1.1 Nacionales

Taylor P. Purca P. (2013) realizaron el estudio del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre flora salival, en donde obtuvieron 3 concentraciones de dicho extracto frente a microorganismos que habitan en la flora salival, usaron clorhexidina 0,12 % para control positivo y para control negativo agua destilada. Escogieron a 22 participantes que se atendieron en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM, en donde fueron tomadas las muestras de saliva para su evaluación microbiológica. Se sembró en medio de cultivo Agar Tripticasa soya, usándose el método de difusión en pocillos incubándose por 24h y 48h a 37°C. Se obtuvo halos de inhibición en promedio de 12,47 mm para 25 mg/ml, 17 mm para 50 mg/ml, 20,56 para 75 mg/ml, 15,56 para la clorhexidina 0,12 % y 5 mm para el agua destilada. De los resultados se demostró que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. posee resultado antibacteriano sobre flora salival ⁽¹²⁾.

Isabel de María San Román S. (2013) realizó el estudio de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias habituales en enfermos con periodontitis crónica. Tomando como control positivo a la clorhexidina 0,12 %. Se eligió a 24 participantes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica, quienes fueron atendidos en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se tomó la prueba con conos de papel número colocándose en el saco periodontal durante 30 segundos, para su evaluación microbiológica. Se utilizó el procedimiento de difusión en pocillos con las soluciones

experimentales incubándose en situación de anaerobiosis, por 48 h a 37 °C, después se realizó la lectura de los diámetros del halo de inhibición. Como resultado se determinó existencia de efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *R. officinalis* a una concentración de 75mg/ml con la clorhexidina 0,12 % en cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica⁽¹³⁾.

Dalguerre V. (2015) estudio la evaluación de formulados naturales a base de Ajenjo (*Artemisia absinthium* L.), para el control de Pulcon Verde (*Macrosiphum* spp.) en lechuga (*Lactuca sativa*.) tuvieron como objetivo determinar si el Ajenjo (*Artemisia absinthium* L), posee cualidades insecticidas para eliminar al pulgón verde de la lechuga. Del Ajenjo que se recolectó se obtuvieron las hojas y las flores que fueron sometidas a desecación hasta un 10% de humedad, elaborándose cuatro tipos distintos de bioinsecticidas, las mezclas se usaron individualmente con tres repeticiones, en condiciones hidropónicas a los cultivos de lechuga infectadas con 10 pulgones verdes cada planta, incrementando dos grupos control, uno positivo y otro negativo. Se hizo el seguimiento en forma diaria por 15 días de la aplicación. Se concluyo que el ajenjo posee cualidades insecticidas y repelentes, con mejor adecuación a la mezcla de purín, extracto y aceite esencial, por su celeridad, efectividad y duración, el purín y el extracto hidro alcohólico solos tuvieron efectividad mas no rapidez y el aceite esencial tienen rapidez, pero en forma breve por lo que al transcurrir unos días los pulgones volvieron a aumentar⁽¹⁴⁾.

Melissa N. Gutiérrez M. (2013) en su tesis titulada efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), sobre la viabilidad de *Streptococcus B-hemolítico* in vitro. Se emplearon cuatro concentraciones de 250, 500, 750 y 1000 mg/ml de extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. recolectadas en el

caserío de Jesús María del distrito de Simbal, Departamento de La Libertad y cultivos apartados de secreciones faríngeas de los estudiantes de VII ciclo de microbiología. Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo y usaron la penicilina como control de inhibición. A fin de calcular la reacción del extracto en el microorganismo se usó el método de Kirby Bauer variado, sembrando un inóculo estandarizado con el patrón de turbiedad 0.5 de Nefelómetro de McFarland en placas de Agar Mueller Hinton por la técnica de siembra de superficie. Concluyéndose afirmando que el promedio de los halos de inhibición de los cultivos de *Streptococcus B-hemolítico* conseguidos en las diversas concentraciones ensayadas, cambia de 22,3 a 37,3 mm. Cuanto más se concentra el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus Officinalis* L. “Romero” en el rango de 250 a 1000 mg/ml, es más el diámetro de halo de inhibición de *Streptococcus B-hemolítico* ⁽¹⁵⁾.

Loja M. (2017), estudió el efecto antibacteriano in vitro de un colutorio elaborado hecho con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) en *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. La investigación se realizó en el laboratorio de microbiología de la Universidad Señor de Sipán. Se usó como muestra 100 uL de colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. y una suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* concentrado de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Se usaron dos métodos. Primero el de difusión en placa comprobándose la capacidad antibacteriana del colutorio y segundo el de microdilución en microplaca estableciendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Resultó que el colutorio hecho de extracto alcohólico de *R. officinalis* posee efecto antibacteriano in vitro ante el *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* imponiéndose al control positivo Gluconato de clorhexidina al

0,12% con un 30% de inhibición. Además, se determinó la CMI y la CMB del colutorio hecho de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans* que fue de 2 mg/mL y 5 mg/mL. Para *Enterococcus faecalis* la CMI y la CMB del colutorio hecho a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* fue de 3 mg/mL y 6 mg/mL respectivamente ⁽¹⁶⁾.

Barrios F. Quispe P, (2017) en su tesis titulada “Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. sobre *Staphylococcus aureus*” en la investigación se determinó el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Artemisia absinthium* L. “Ajenjo” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Como resultado en el análisis fitoquímico se descubrió la existencia de taninos condensados y de flavonas. Por otro lado, se determinó un rendimiento promedio de $0.13 \pm 0.01\%$ de aceite esencial por el procedimiento de arrastre de vapor. En cromatografía en capa fina se identificó la existencia de taninos con Rf de 0.52 y 0.89. Resultó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial fue $6.25 \mu\text{L/mL}$, equivalente a 0.63%; por otro lado, la concentración mínima bactericida fue determinada por el procedimiento de siembra en placa, siendo esta de $12.5 \mu\text{L/mL}$ equivalente a 1.25% del aceite esencial. Finalmente se determinó la sensibilidad bacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en diversas concentraciones que van desde 0.16 hasta el 100% de aceite esencial de *Artemisia absinthium* L “ajenjo”, con halos de inhibición de 3.1 a 19.5 mm excepto a la concentración de 0.16%, así mismo, no se encontró halos de inhibición en los discos con etanol absoluto, por otro lado al comparar con eritromicina se encontró que ninguna concentración de aceite esencial se iguala a la potencia antibacteriana de la eritromicina debido a que el halo máximo a 100% de aceite esencial fue de 19.5 mm y el de eritromicina de 29.1 mm ⁽¹⁷⁾.

2.1.2 Internacionales

Marcela A et al (2016) Dentifrice Containing Extract of *Rosmarinus officinalis* Linn: An Antimicrobial Evaluation. El objetivo fue evaluar el efecto antimicrobiano de un dentífrico que contiene un extracto alcohólico de romero en bacterias orales, en comparación con un dentífrico a base de hierbas disponible en el mercado. Se usaron cepas estándar de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 9811) y *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 7469), también distintas pastas de dientes basadas en romero (TR), propóleo (TH), Triclosan (control positivo) (TPC) y dentífrico no fluorado (control negativo) (TNC). Las bacterias se sembraron en placas de Petri y los discos de papel empapados con diluciones de dentífrico se colocaron en las placas. Se analizaron los halos de inhibición. Se observó que la TR no mostró una diferencia estadística en relación con la TH para inhibir a *S. mutans* y *S. oralis*, mientras que la TH fue más activa contra *L. rhamnosus*. La pasta de dientes que contenía extracto de romero tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. mutans*, *S. oralis* y *L. rhamnosus*, revelando una actividad antimicrobiana similar a las pastas dentales disponibles comercialmente para la inhibición de *S. mutans* y *S. oralis* ⁽¹⁸⁾.

Azuero A et al (2016) realizaron el estudio del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de utilización patrimonial en Ecuador, el objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metabólicos conseguidos, se realizó la técnica de difusión en agar, probándose ante cepas de bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativa (*Escherichia coli* y *P. aeruginosa*), y una cepa del hongo (*Candida albicans*). Todos los extractos analizados, a excepción de los *L. citriodora* y *A. conyzoides*, mostraron una acción antiséptica frente al total de las cepas bacterianas experimentadas, esto demuestra la significancia de esas

especies en la elaboración de fitofármacos antibióticos. *T. officinale* y *P. Carpunya* mostraron un resultado antibacteriano alto frente a *E. coli*; pero, *S. aureus* no mostro sensibilidad ante los extractos de *L. Citriodora* y *P. Carpunya*. Concluyéndose que dichas plantas conforman una gran fuente de compuestos químicos antimicrobianos muy valorados farmacológicamente ⁽¹⁹⁾.

Lozada M. (2016) en su tesis titulada “Estudio fitoquímico y evaluación de actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619, *Streptococcus pyrogenes* ATCC: 19615 de extractos apolares (Cloroformo –Hexano) de *Croton elegans Kunth* (Mosquera)”. Evaluó los extractos clorofórmicos y hexánicos de las hojas de Mosquera, conseguidos bajo la técnica Soxhlet en concentraciones de 25% y 50 %, mediante un análisis cualitativo de los grupos fitoquímicos, en donde se halló metabolitos secundarios: resinas, aminoácidos, quinonas, alcaloides, flavonoides, catequinas. Se valoró el trabajo antibacteriano por la técnica de difusión Kirby –Bauer y de dilución en medio líquido. Concluyendo que no se evidencio inhibición en ninguna de las concentraciones aceptándose la hipótesis nula al no evidenciar actividad antibacteriana de los extractos sobre los microorganismos de estudio ⁽²⁰⁾.

Lizcano A. et al. (2008) en su tesis titulada “Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles Ferruginea*, *Myrcinthes Rhopaloides* y *Passiflora Manicata* frente a microorganismos Patógenos y Fitopatógenos”. Para obtener los extractos Etanólicos se usó el material vegetal seco molido de forma previa, macerándose en frio usando de solvente el etanol por dos días, se hizo reflujo con etanol-agua (9:1) para luego concentrarlo a presión disminuida. Para conseguir el aceite esencial desde la hoja *Myrcinthes*

Rhopaloides se trabajó con el método de hidrodestilación. Después de conseguir los extractos a evaluar la actividad antimicrobiana fue medida usando la técnica de difusión de disco en agar de Kirby-Bauer, este ensayo posibilitó el medir la susceptibilidad in vitro de los microorganismos patógenos y fitopatógenos escogidos ante sustancias naturales con viabilidad antimicrobiana, usando 300 ug de extracto conseguido por espécimen vegetal, usando como control positivo 10 ug de cloranfenicol y agua estéril como control negativo. Analizando la respuesta de los diversos ensayos se percibió que el extracto hidroalcohólico de la *Passiflora manicata* tenía más actividad antimicrobiana ante el *E. coli*, *Candida albicans* y *B. subtilis*, por ellos fue seleccionada para fragmentar el extracto crudo usando algunos solventes Diclorometano, agua y alcohol isoamílico, manifestando que la fase acuosa tuvo más efecto inhibitorio ante todos los microorganismos que se evaluaron. Los resultados afirmaron que el aceite conseguido con las hojas de *Myrcianthes rhopaloides* se inhibieron solamente ante la *Candida albicans*, concluyendo que *Passiflora manicata* fue el extracto etanólico con más respuesta ante el total de los microorganismos, haciendo posible la separación con los diversos solventes dando como autor del principio activo con potencial antimicrobiano a la fase acuosa⁽²¹⁾.

Artemisia absinthium L. denominada también Ajenjo o *artemisia amarga*, hierba santa, ajenjo mayor, alorma, encencio, asintió, ajea, aluino, altamisa, incincos, es una hierba medicinal, del género *Artemisia*, oriunda de Europa, Asia y norte de África, en este momento se encuentra esparcida mundialmente, llamada "madre de todas las hierbas" en el libro "Tesoro de los pobres" realizado por el Papa Juan XXI en el año 1277.

Tiene un olor característico usado como pesticida. En tiempos lejanos era usado como insecticida para matar a las polillas las cuales se comían las prendas. Las segregaciones de sus raíces tienden a inhibir el crecimiento de plantas colindantes. También se usa para preparar licor de ajenjo o absenta, bebida hoy en día prohibida en muchos territorios ya que es alucinógena, neurotóxico siendo en mucha cantidad adictiva y hasta mortal.

2.2.1.3 Características etnobotánicas

Artemisia absinthium L. dependiendo de sus características contiene del 0,2 al 0,5 % de una esencia verdosa o azulada, su sabor es amargo y su componente primordial, la tuyona, es fácil de disolver en alcohol, mas no en agua. Esta planta también posee absintina, la cual es una sustancia amorfa amarillenta, que no de fácil solución en alcohol, pero sí en agua.

Artemisia absinthium L. es una hierba, con un rizoma consistente y duro, llena de finos pelos color plateado, tallo erecto y ramificado. Sus hojas pinnadas alternas se dividen en segmentos en forma de triángulo, con cada subdivisión angosta y lobulada. Flores 4-6 mm de diámetro, en cabezuelas hemisféricas profusas, se distribuyen en todo el tallo. Florece en temporada de verano y otoño ⁽²³⁾.

Su propagación es por semillas o esqueje. Sus semillas son sembradas en arena fina, germinando en 15 días, en filas de 25x25cm y se riega diariamente. Se recolectan en plena floración, en el primer año al inicio del follaje; a partir del segundo año se hace dos cortes por año. Una plantación vive aproximadamente 6-8 años ⁽²⁴⁾.

2.2.1.4 Composición Química

Artemisia absinthium L. tiene como principios activos a las lactonas sesquiterpénicas, las cuales la hacen amarga, contienen del 0.15% - 0.4%, son básicamente de tipo guayonólido, sobresaliendo la absintina, el aceite esencial cambia según proceda y alcanza más de 40% de la esencia.

El mono y sesquiterpeno encontrados en menor concentración son la tuyona, tuyano, tuyol, linalol, lineal. Otros principios activos de la droga son: flavonoides, ácidos fenólicos y taninos. Según la Farmacopea Europea contiene posiblemente un 0.2% de aceite esencial deducido respecto a la droga desecada ⁽²⁵⁾.

2.2.1.5 Propiedades farmacológicas

Entre sus propiedades la de mayor importancia es la estimulante y digestiva innata por su característico amargor, el aceite de ajeno posee un efecto carminativo en las dosis correctas también es expectorante, antihelmíntico, antibiótico, antifúngico y espasmolítico. Si se aplica de forma adecuada posee propiedades medicinales como:

Efecto tónico gástrico el cual se desarrolla sobre el estómago, dando más hambre y provocando la segregación de jugo gástrico, lo cual está contraindicado para aquellos que tienen úlceras. El ajeno no se debe ingerir si no existe necesidad.

Las hojas son empleadas en enfermedades nerviosas y hepáticas, flujo vaginal, trastornos menstruales, afecciones gastrointestinales, como desinfectante de laceraciones y granos, como tratamiento antiinflamatorio, tumores, artritis reumática o gotosa y aliviar torceduras (26) .

Colerético, pues aumenta la secreción biliar, lo cual es bueno para el hígado ya que desinflama y estimula sus funciones. Es apropiada cuando existe insuficiencia hepática, y en las hepatitis víricas, más que nada en la fase de recuperación.

Emenagogo potente, procede como un regulador menstrual. Es recomendable para jóvenes de color pálido y débiles, que generalmente sufren de menstruaciones con irregularidad y dolor.

2.2.2 *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

2.2.2.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Rosmarinus*

Especie: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombre Común: “Romero”

2.2.2.2 Historia



Figura 2. Vista general de *Rosmarinus officinalis* L “Romero”
Fuente Línea y Salud, 1887⁽²²⁾

Rosmarinus officinalis L. usado antiguamente como hierba curativa y en la obtención de aceites esenciales. Se comenta que los antiguos egipcios (faraones) colocaban encima de sus sepulcros un ramo de romero como aromatizante de su marcha espiritual. Su aceite esencial se obtuvo primero en 1330 por Ramón Llull utilizándose en perfumería hasta hoy.

En el siglo XVI la reina Isabel de Hungría lo usó como tratamiento del reumatismo que tenía transformándose así en , “el agua de la reina de Hungría”, siendo un medicamento muy popular en la corte de Luis XIV. Los boticarios usaban el romero en muchas medicinas, pero actualmente solo el aceite esencial está incluye en las farmacopeas. Su calificativo genérico, *Rosmarinus* es proveniente de la fusión de dos vocablos griegos, rhops, arbusto y myrinos, aromático; coincidiendo con las características de la planta; el nombre específico, *officinalis*, expresa su uso curativo.

El Romero se halla dispersa en el mediterráneo, más que nada en el sur de Europa, norte de África y suroeste de Asia, mayormente en la Península Ibérica en el medio sur y en el este. El género *Rosmarinus* tiene muchas variedades, entre ellas; *R. officinalis*, *R. eriocalyx* y *R. tomentosus* y otras diversidades de taxones, viene del griego “rhops y myrinos” cuyo significado es arbusto marino por encontrarse muy cerca de las costas.

2.2.2.3 Características etnobotánicas

Rosmarinus officinalis L. corresponde a la familia *Lamiaceae* y al género *Rosmarinus*, proveniente del latín *rosmarinum* (rocío marino), posee escasas especies, pero con una alta tasa de hibridación por presentar mucha similitud morfológica haciendo difícil la tarea de identificación⁽²⁷⁾.

Es una planta leñosa, arbustiva y permanente. Posee hojas coriáceas de 15 a 40 mm de longitud, contrarias, estrechas y lanceoladas, sus bordes son enteros, el haz de una coloración verde brillante y el dorso blanquecino de textura suave. Sus flores provienen de las axilas de las hojas creciendo agrupadamente en racimos chicos; el cáliz es caracterizado por tener dientes bordeados de coloración blanca y textura leñosa. La corola es azul o lila pálido tornándose a rosa, mide de 10 a 12 mm. Los estambres son fijos dentro del tubo de la corola, tienen en su base un diminuto diente el cual acaba en dos anteras con un saco⁽²⁸⁾. Florecen en primavera y otoño, crece en matorrales mediterráneos, y se ubica en laderas soleadas y montañosas junto del mar y protegiéndose del viento.

2.2.2.4 Composición Química

El Romero es una planta que ha reportado diferentes compuestos químicos tales como: ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpenicos y alcoholes triterpenicos, el aceite esencial es el elemento con mayor estudio a nivel cualitativo, de forma global, la composición química del aceite esencial de romero es nombrada en diversos estudios que señalan la clase de moléculas activas actuales. Cuenta con un buen porcentaje de ácido rosmarínico y su variante rosmaricina, ácido carnósico tiene la característica de ser inestable, se degrada al aumentar la temperatura y por exponerse a la luz; se oxida ante el oxígeno formando carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7- metil-epirosmanol ⁽²⁹⁾.

2.2.2.5 Composición nutricional y farmacológica

Los beneficios nutricionales más destacados son: el hierro (2% de las IR en varones y 1% en féminas) y la vitamina B6 (1% de las IR en varones y féminas). Por otro lado, es una planta con muchos principios activos actuando sobre varios órganos.

Las hojas y sumidades floridas de romero poseen taninos, vitamina C, ácido rosmarínico, una saponina y el alcaloide rosmaricina las cuales son de efecto estimulante. Posee asimismo propiedades aperitivas, estomacales actuando como colerético y depurativo en el hígado y la secreción de la vesícula biliar. Su contenido en aceite esencial sirve de tónico y estimulante sobre los sistemas circulatorio y nervioso. Como uso externo es desinfectante, calmante, balsámico y estimulante del cabello ⁽³⁰⁾.

Por otro lado, las hojas cuando recién se cosechan se usan para elaborar vinagres, también es usado como aromatizador de aceites y mantequillas. Las hojas secas se usan como acompañamiento de

carnes y para aromatizar salsas o guisos. Su comercialización generalmente es como especia y aromatizante de potajes⁽³¹⁾.

2.2.3 Extractos

Sustancia concentrada de consistencia sólida, líquida o media. Son procedentes de materia seca vegetal, conseguidas por evaporación parcial o total del disolvente en los líquidos.

2.2.3.1 Clasificación de extractos

- **Los extractos fluidos:** Con la concentración adecuada de etanol, se preparan de tal manera que una o dos partes de la droga corresponden al extracto fluido. 85 partes de droga seca valen como 100 de la planta fresca, su extracto se consigue por percolación.
- **Los extractos secos:** Son de seca consistencia y se pulverizan de forma fácil consiguiéndose cuando se evapora el disolvente y deseca el sobrante. Los extractos secos no presentan humedad de más del 5%. Por otra parte, como se trate de producto seco, poseen mayor concentrado de principio activo que la droga inicial, como fluido extractor se usa alcohol y agua.
- **Extractos Blandos:** Tienen una concentración alta de principio activo en comparación a la droga propia semisólida. El solvente puede ser agua o mezcla hidroalcohólica y no poseen estabilidad por ello no son frecuentemente usados.

2.2.4 *Streptococcus mutans* ATCC 25175

2.2.4.1 Clasificación Taxonómica

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: *Lactobacillales*

Familia: Streptococcaceae

Género: *Streptococcus*

Especie: *Streptococcus. mutans*

2.2.4.2 Características morfológicas

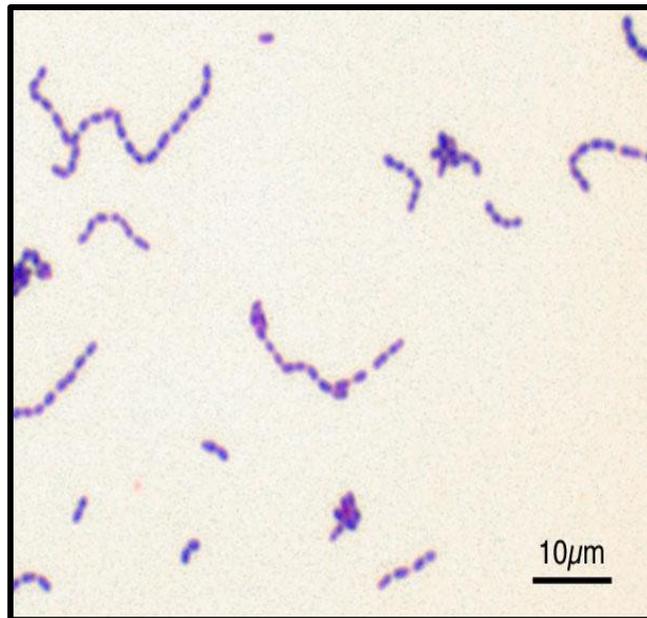


Figura 3. Vista general de la cepa de “*Streptococcus mutans*”
Fuente Sánchez G, 2003⁽²³⁾

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa que se halla ordinariamente en la boca de los humanos, siendo parte de la placa dental. Dicha bacteria se asocia al principio y progreso de la caries dental. Es un neutrófilo porque subsiste en medio con pH neutro, es acidogénico por metabolizar los azúcares a ácidos y acidúrico por reducir ácidos, aunque se encuentre en esas condiciones. Metaboliza la sacarosa para elaborar polisacáridos extracelulares (sustancia laxa que hace sencilla la adhesión a las piezas dentarias libres) e intracelulares (metabolismo energético). En estado de salud,

una cantidad normal de dichas bacterias en la boca es de menos de 100.000 UFC.

Su ambiente esencial es la superficie dentaria del hombre, sin embargo, también se identifican en la boca. Un alto nivel de sacarosa de la dieta motiva la aparición en la placa⁽³²⁾.

Estructuralmente, no es diferencial de las generalidades de los *estreptococos*, excepto por la falta de cápsula, polisacárido C, complejos fibrilares y las fimbrias que al estar tienen poca prominencia. Contrariamente, en la pared sobresalen proteínas proporcionadas de diferentes funciones, y polisacáridos, distintos del C. Dichos polisacáridos poseen diferentes especificidades antigénicas, posibilitando que se diferencie los serotipos a, b, c, d, e, f, g y h⁽³³⁾.

Los *Streptococcus* del grupo *mutans* son genéticamente heterogéneos pudiendo dividirse en diferentes tipos. Esto es factible a través del estudio de estructuras antigénicas que posibilitan el conocer por lo menos 8 serotipos, que se nombran por letras desde la A hasta la H.

2.2.4.3 Metabolismo de la Sacarosa

El sustrato de mayor importancia para dichos microorganismos como agentes etiológicos de la caries es la sacarosa. De su metabolización nace la elaboración de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares. Con sacarosa presente el *S. mutans* elabora un glucano extracelular, polímero de la glucosa, que posibilita instalarse encima de las superficies dentarias formando una placa pegajosa muy cariogénica.

El *S. mutans* es acidogénico y acidúrico, siendo la propiedad de mayor importancia de su potencial cariogénico. Solamente una mínima fracción de la sacarosa se deriva formando polisacáridos extra e

intracelulares; el resto es usado como fuente energética para desarrollar los la *Streptococcus* ⁽³³⁾.

2.2.4.4 Cultivo

Son anaerobios facultativos. La temperatura ideal de preparación es de 36 + 1° C. Aunque pueda reproducirse en el aire, una práctica aconsejable es incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y luego, otras 24 horas en aerobiosis; favorecerá a formar agua oxigenada, que es un significativo carácter diferencial, además la síntesis de polisacáridos extracelulares que, algunas veces facilitan reconocer las colonias.

La transmisión puede darse de forma directa por medio de la saliva de quienes rodean al niño y de forma indirecta, usando cosas infectadas que el niño se mete a la boca como el cepillo de dientes, chupones, mamaderas, tenedores y cucharas contagiadas con flora bacteriana ⁽³⁴⁾.

Los monitoreos microbiológicos referidos al *S. mutans* se asocian a otros indicadores que reconocen el nivel de riesgo cariogénico ⁽³⁵⁾.

Los *Streptococcus* del grupo *mutans* son los patógenos primordiales que incrementan la caries dental. Una colonización anticipada predice un riesgo mayor de padecer caries dental en la dentición decidua. Sin embargo, los riesgos asociados a colonizar en la boca de los infantes no están completamente claros. Además, el inicio de esta colonización aún es una controversia.

2.3. Formulación de la Hipótesis

2.3.1 Hipótesis general

- El extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) posee efecto antibacteriano in vitro frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2.3.2 Hipótesis específica

1. Existen metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).
2. Existe una concentración óptima del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que genere efecto antibacteriano, in vitro, en cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
3. Existe efecto antimicrobiano del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con el Ciprofloxacino en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

2.4. Variables

2.4.1 Tabla de Operacionalización de Variables

TABLA 1. Operalización de Variables e Indicadores

Variable independiente Extracto Etanólico del <i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero).	Indicador - Metabolitos secundarios - Grado de concentración en mg/Kg	Escala de medición Diferentes Concentraciones: 100%, 75%, 50%, 25% Tiempo: 24 horas
Variable dependiente Efecto Antibacteriano de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Indicador -Halos de inhibición (mm) <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Escala de medición -Medida del diámetro de halos de inhibición

Fuente: Elaboración propia, 2019.

2.5. Marco conceptual

- **Actividad antibacterial** : Es la capacidad que posee un producto para destruir o matar gérmenes o bacterias.
- **Antimicrobiano**: Elemento que mata o elimina los microbios, virus u hongos.
- **Antibiótico**: Elemento o sustancia que destruye microorganismos que generan infecciones o enfermedades (bacterias).
- **Antiséptico**: Sustancia utilizada para combatir los gérmenes. Puede usar en la piel.
- **Bacteriostático**: Puede frenar la propagación, mas no elimina, inhibidores de la síntesis de proteínas.
- **Bactericida**: Es capaz de matar los microorganismos, aunque en ocasionalmente funcionan sobre los que se multiplican(β -lactámicos).
- **Cepas ATCC**: Material biológico de referencia certificado por American Type Culture Collection (colección de cultivos de tipo americano).
- **Cultivo microbiológico**: Proporciona las condiciones físicas, químicas y nutritivas recomendables para la multiplicación controlada de microorganismos
- **Desinfectante**: Sustancia que sirve para desinfectar objetos.
- **Extracto etanólico** Es una sustancia obtenida por sustracción de una materia prima utilizando al etanol como solvente.

- **Extracto vegetal:** Es una sustancia vegetal proveniente de plantas o parte de ellas con distintos procesos y diversos solventes.
- **Halo de inhibición:** Zona que rodea un disco el cual posee extracto antibiótico situados en un antibiograma donde no se crea el desarrollo antibacteriano.
- **In vitro:** Método con el fin de estudiar las reacciones ocurridas en un espacio imitado fuera del organismo.
- **Maceración:** Cuando la droga mantiene contacto de forma prolongada por un cierto tiempo con el menstruo formando un conjunto uniformemente mezclado en el cual el menstruo opera de forma simultánea sobre todas las proporciones de la droga.
- **Metabolitos:** Son compuestos los cuales posibilitan en ejecutar a las células sus diversas funciones. Se dividen en dos según su importancia para el metabolismo celular: metabolitos primarios y metabolitos secundarios.
- **Prueba de solubilidad:** Procedimiento que se realiza en laboratorio, tiene la capacidad de disolver una sustancia con otra llamada solvente y va a depender de la cantidad de soluto que se va a disolver en una cantidad determinada de disolvente.

CAPITULO III

MÉTODO

3.1. Tipo del estudio

Estudio de tipo aplicado ya que se distingue por tener propósitos proactivos, los investigadores realizaron un estudio con el propósito de actuar, transformar o modificar la realidad problemática descrita. Así mismo es aplicada por que se contó con bases teorías científicas

Por su condición es transversal ya que el periodo tomado para la investigación fue uno solo, no se consideró intervalos, en este caso las muestras se recolectaron en un periodo determinado y el proceso microbiológico usado para medir el efecto fue el único ensayo hecho durante una semana en un solo periodo de tiempo

3.2. Diseño a utilizar

Su diseño es experimental, ya que los investigadores diseñaron el procedimiento experimental y la distribución de los grupos control positivo, grupos experimentales para lograr una comparación en el efecto presentado por el extracto etanólico sobre las bacterias estudiadas.

Se realizó la manipulación de la variable independiente deliberadamente, con el fin de ver que causa sobre la variable dependiente. El diseño se basó en un grupo control y un experimental, los cuales fueron medidos mediante fichas de observación para registrar los hallazgos.

El nivel fue el exploratorio, debido al uso de instrumentos de medición que registraron todos los procesos generados en la manipulación de las variables, su principal propósito fue dar solución y explicación a un problema común como son las infecciones bacterianas.

Así mismo la investigación es una Investigación Cuantitativa ya que se busca dar respuestas objetivas y puntuales del objeto de estudio.

También es de nivel experimental puesto que la variable independiente manipulada y se mide su efecto o reacción sobre la variable dependiente, del mismo modo debido al escaso precedente de referencia en investigación, sobre los efectos in vitro de las plantas estudiadas, durante la distribución de los grupos experimental diseñado por el investigador fue de vital importancia el control de las variables intervinientes donde se produjo el efecto antibacteriano, ante todo lo mencionado se utilizó un método analítico, experimental, observacional, exploratorio y descriptivo

3.3. Población

- Hojas de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).
- Cepas de bacteria de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

3.4. Muestras

- Extracto Etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) de 100 %, 75 %, 50 % y 25 %
- Placas Petri con cepas de bacteria de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 del laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.5.1 Técnica de recolección de datos

- Prueba de sensibilidad Método de Kirby-Bauer

3.5.2 Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos fueron la ficha de recolección de datos de la marcha fitoquímica y el análisis microbiológico los cuales fue realizado por los autores para recolectar la información y realizar la prueba de estudio y su validación se hizo mediante la técnica del juicio de expertos, en bases a los indicadores y criterios tuvieron una mínima y máxima calificación (Ver anexo N°1).

Los expertos fueron tres Químicos Farmacéuticos especialistas en farmacognosia, farmacología, microbiología y amplia experiencia.

TABLA 2. Resumen de resultados juicio de expertos

Juez experto	Resultados	Condición
Vilches Caceda Héctor	75	Valido aplicar
Flores López Oscar	100	Valido aplicar
Jacinto Hervías Pedro	90	Valido aplicar

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Después de la revisión se llegó a la conclusión que el instrumento es válido y aplicable el cual presento coherencia y viabilidad para la realización del proceso experimental.

Los datos que permiten obtener la relación de las dos variables de investigación han sido conseguidos eficientemente tanto en la maceración, las pruebas de identificación y luego el tratamiento microbiológico en las placas Petri. Todo el diseño experimental fue realizado con la guía y supervisión del proceso validado lo cual permitió obtener datos confiables para el análisis estadístico.

3.5.3 Delimitación de la muestra

- El presupuesto se limitó al estudio de las especies en mención usando el método de maceración etanólica, el cual demoro un promedio de un mes aproximadamente.

- El estudio se limitó a informar aspectos tales como la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto para lo cual se midió el efecto terapéutico frente a *Streptococcus mutans*.
- El estudio estuvo limitado a hacer un estudio experimental in vitro, no fueron usados animales para experimentar.
- El desarrollo del proceso microbiológico fue realizado en los laboratorios de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con coordinación previa con el área encomendada.

3.5.4 Equipos, reactivos y materiales

TABLA 3. Equipos

Equipos:	Baño María EQ-CCA-009 Mettler WNE-10 S: L307.0363	Estufa EQ-CCA-001 Mettler UN55 S: B215-2490
	Mechero Bunsen	Balanza analítica EQ-CCA-037 AND HR 250 AZ S: GA7702480
	Potenciómetro EQ-CCA-005 Inolab 730 S: 10380849	Autoclave Vertical Digital EQ-CCA-054 Reles AL/D 50L S: 476-15
	Incubadora 35°C EQ-CCA-026 Labor LP-11 S: 69-6315/4	

Fuente: Elaboración propia, 2019.

TABLA 4. Reactivos

Reactivos:	Hidróxido de amonio	Cloruro Férrico
	Fehling A	Fehling B
	Reactivo de Dragendorff	Agar nutritivo (Agar Mueller Hinton4 marca Scharlau)
	Etanol 96°	Staphylococcus aureus ATCC 6538
	Reactivo de Kedde	Suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%)
	NaOH 40%	HCL 37%
	H2SO4 al 10%	HNO3
	Reactivo de Baljet	Limaduras de magnesio
	Agua destilada	Reactivo de Liebermann Burchard concentrado
	Cloruro de sodio grado bacteriológico marca Oxoid	

Fuente: Elaboración propia, 2019.

TABLA 5. Materiales

Materiales	<ul style="list-style-type: none"> - Vernier digital Caliper Model: DC-515 - Placas Petri de vidrio 90mm de diámetro x 15mm de altura - Asa de Drigalsky de vidrio - Tubos 150mm con tapa rosca - Viales de vidrio de 5mL de capacidad - Puntas para micropipeta de 20-200 µL - Puntas para micropipeta de 0.5-5mL - Micropipeta calibrada de 20-200µL - Micropipeta calibrada de 0.5-5mL - Frascos de vidrio de 500mL de capacidad con tapa rosca - Frascos de vidrio de 200mL de capacidad con tapa rosca - Viales de vidrio de 10mL de capacidad. - Gradilla - Espátulas - Sacabocado con diámetro interno de 6mm - Papel Kraft - Asa bacteriológica - Escala de Mac Farland - Baguetas de vidrio - Indicador multiparámetro de esterilización.
-------------------	--

Fuente: Elaboración propia, 2019.

TABLA 6. Medio de cultivo

Medios de cultivo	Inóculo
<ul style="list-style-type: none">- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) marca Merck- Agar Cerebro Corazón marca Merck	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175

Fuente: Elaboración propia, 2019.

3.5.5 Parte experimental

3.5.5.1 Técnica experimental

La obtención del extracto etanólico fue obtenido a través del método de maceración y mediante marcha fitoquímica se identificaron los metabolitos secundarios presentes en ambas plantas, dicho procedimiento se realizó mediante el uso de los reactivos correspondientes.

3.5.5.2 Método de maceración

En este procedimiento se realiza una extracción a temperatura ambiente, donde se remoja los insumos que se desecaron antes en un solvente de etanol, luego fueron colocados en un frasco de color ámbar de vidrio, tapándolo y dejando en reposo de 2 a 15 días removiendo a diario por toda dirección y sentidos, filtrando el líquido y exprimiendo el residuo, recuperando el solvente en un evaporador giratorio y obteniendo el extracto.

La droga seca y triturada con el disolvente que puede ser agua, glicerina o mezclas hidroalcohólicas, es capaz de solubilizar los principios activos de manera que se obtiene un extracto líquido.

Para la realización de dicho proceso las drogas deben de estar desecadas, con grado de división adecuada, el disolvente debe poseer

una naturaleza apropiada, la temperatura de los principios activos, el tiempo de contacto entre la droga y el disolvente y control de difusión celular deben ser los adecuados.

También es conocido como extracción solido-liquido, aquí la planta que tiene una serie de componentes activos es expuesta a solventes orgánicos o inorgánicos dependiendo de qué exactamente se pretende extraer ⁽³⁶⁾.

Usualmente en la industria química se realiza el proceso de extracción, sin embargo, al tratarse de plantas y alimentos se denomina maceración. Existen tipos de maceración: maceración en frío y maceración en calor, dependiendo a las propiedades de la planta ⁽³⁶⁾.

3.5.6 Marcha Fitoquímica

Los análisis fitoquímicos previos son pruebas simples, rápidas y sensibles, que por medio de una reacción química producen o causan una alteración rápida en la estructura molecular del compuesto que hace posible reconocer grupos químicos con actividad biológica de los grupos vegetales acopiados. Dichas reacciones modifican un grupo funcional, el inicio de un sistema anular, la formación de un complejo que puede resultar en el cambio de color, la formación de un precipitado o desprender un gas, a través del uso de reactivos específicos.

Mediante la marcha fitoquímica pueden identificarse diferentes tipos de principios activos como son: alcaloides, flavonoides, esteroides, taninos, sesquiterpenos, lactonas, quinonas, cumarinas, saponinas, glucósidos, grupos carbonilo, aceites esenciales, aceites fijos, resinas, etc.

En los residuos secos de muestras se han ensayado una serie de reacciones analíticas, con el objetivo de evidenciar de forma cualitativa la presencia de diferentes grupos fitoquímicos que caracterizan a cada

extracto. Estos ensayos se realizan sobre el extracto seco una vez re disuelto en su respectivo disolvente⁽³⁷⁾.

Los principios activos que usualmente se hallan endrogas vegetales están en concentraciones limitadas por lo mismo se debe realizar una perfecta extracción de estos. Ya que si esta es deficiente puede confundirse los resultados⁽³⁷⁾.

3.5.7 Método de difusión en placa o método de Kirby Bauer

Técnica de eficacia antimicrobiana que precisa la actividad in vitro de un determinado antibiótico ante un microorganismo y muestra su cabida para impedir que una bacteria crezca. Dicho método es útil para evaluar eficazmente una muestra vegetal con cualidades antimicrobianas ante microorganismos definidos.

El antibiograma por el proceso de propagación en agar es una de las pruebas usadas para hallar que tan sensible es un microorganismo ante un antibiótico. Se fundamenta en la difusión radial de un compuesto de extracto o de antibiótico desde un reservorio mediante una capa de agar que fue transmitida por un microorganismo sensible al antibiótico. Se comparan diversas medidas de la sustancia a examinar en placas con medios de cultivo sólido transmitido por microorganismos convenientes⁽³⁸⁾. Las placas se gestan para posibilitar que el microorganismo se desarrolle. En la incubación, el antibiótico propaga desde su reservorio (con un disco de papel filtro, un pozo excavado en el mismo medio de cultivo con inóculo bacteriano, o diminutos cilindros situados en la superficie del medio) mientras la población microbiana se incrementa por división celular.

La respuesta lograda es una zona clara o halo de inhibición del aumento bacteriano en torno a los reservorios. El límite de la región de inhibición es formado al alcanzar una concentración riesgosa del

antibiótico, es decir, la pequeña concentración que priva el aumento de la población microbiana actual ⁽³⁸⁾.

Los halos de inhibición son medidas con la máxima precisión posible, se usa regla o vernier. La base cuantitativa del ensayo relaciona el diámetro de la zona de inhibición con la concentración del antibiótico ⁽³⁸⁾.

3.6. Procedimiento experimental

3.6.1 Recolección de las plantas e identificación botánica

- La recolección de las plantas se realizó en el distrito de San Mateo de Huanchor localidad peruana que se ubica en la región Lima, provincia de Huarochirí a una altitud de 3149 msnm, en el mes de octubre del 2018.
- Las plantas fueron transportadas para su conservación en papel Kraft y en una bandeja, cumpliendo las Buenas Prácticas de Transporte.
- Se identificó la taxonomía de la planta que fue elaborada por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Marcos. (Ver anexo N° 2).



Figura 4. Distrito de San Mateo de Huanchor
Fuente: Elaboración propia, 2019.



Figura 5. Recolección de las plantas
Fuente: Elaboración propia, 2019.

3.6.2 Preparación del material vegetal

- Se empleó 700 g de hojas *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) se procede a lavar a chorro de agua corriente, con hipoclorito de sodio y agua destilada para eliminar la suciedad



Figura 6. Selección y limpieza
Fuente: Elaboración propia, 2019.

- Las hojas seleccionadas en buen estado se secaron a temperatura ambiente con optima ventilación, bajo sombra por un periodo de 10 días,
- En seguida se procedió al secado de las muestras en estufa a 40 °C, por un tiempo prolongado de 48 horas.



*Figura 7. Secado de las plantas
Fuente: Elaboración propia, 2019.*

3.6.3 Obtención del extracto etanólico

- Se realizó la molienda de las muestras con un mortero hasta reducir su tamaño en fragmentos pequeños con el cual se obtuvo 400 g.
- Se agregaron las muestras a un frasco de vidrio color ámbar de 1 L más 700 mL de Etanol a 96° como disolvente, se agito y mezclo hasta que se cubrió toda la muestra propiamente rotulada con la solución.
- Se tapó el envase y se almaceno por 12 días sacudiendo diariamente en todas las direcciones y sentidos.
- Después de la maceración se sacudió las muestras, luego se filtró separando la masa solida de líquido, se decantó por 20 minutos filtrándose por segunda vez utilizando papel filtro.

- Se empleó el uso del rotavapor mediante destilación al vacío para una evaporación rápida del disolvente y así recuperar el soluto a 70 °C y 90 revoluciones por minuto durante 2 horas.



Figura 8. Filtrado de la maceración

*Fuente
: Elaboración propia, 2019.*



Figura 9. Destilación al vacío de la maceración

Fuente: Elaboración propia, 2019.

EL PRESENTE FLUJOGRAMA SE MUESTRA EL TRATAMIENTO REALIZADO A LA MUESTRA SÓLIDA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

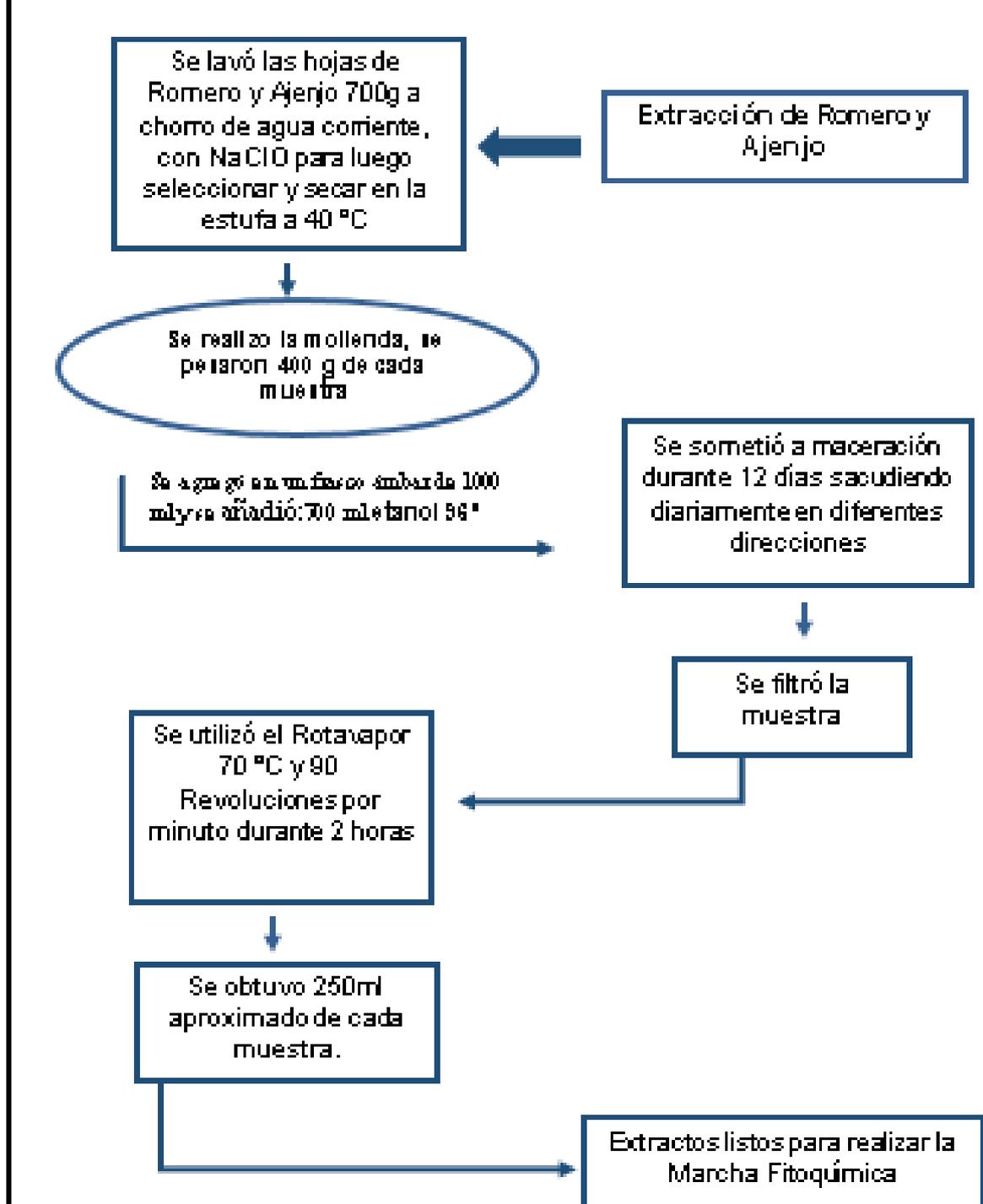


Figura 10. Flujoograma del tratamiento a las muestras solidas de *Artemisia absinthium* L. "Ajenjo" y *Rosmarinus officinalis* L."Romero".

Fuente: Elaboración propia, 2019.

3.6.4 Marcha Fitoquímica de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)

- **Identificación de Carbohidratos Reductores:**

Ensayo de Fehling: En un tubo de ensayo agregar 2 mL de extracto etanólico, adicionar 3 gotas de solución de Fehling A y 3 gotas de solución de Fehling B, calentar a fuego directo. Se observa la presencia de precipitado rojo ladrillo.

- **Identificación de Azúcares:** En un tubo de ensayo agregar 2 mL de extracto etanólico, adicionar 2 gotas de α -naftol al 1% y mezclar bien, con una pipeta se dejan deslizar por la pared del tubo de ensayo 2 mL de ácido sulfúrico concentrado cuidadosamente intentando no mezclarlo para que no se mezcle y pueda formarse una capa bajo la disolución de azúcar. En la superficie de separación de las dos capas se originaría la deshidratación del azúcar reaccionando con el α -naftol para formar un anillo de color oscuro.

- **Identificación de alcaloides:**

Ensayo de Dragendorff: En un tubo de ensayo se adiciona 2 mL de extracto etanólico, se agrega 1 mL de HCl 10% y se calienta a 60°C por un lapso de 10 minutos; luego se agrega el reactivo de Dragendorff. Se deberá observar la presencia de precipitado anaranjado - marrón.

Ensayo de Mayer: En un tubo de ensayo agregar 2 mL de del extracto etanólico, se adiciona 3 gotas de reactivo de Mayer. Se observa un precipitado blanco.

- **Identificación de Compuestos Fenólicos Reactivo Fe Cl₃ al 5%:** En un tubo de ensayo, se agregó 2 mL de extracto etanólico,

3 gotas de reactivo y se agitó lentamente. Se deberá observar la coloración azul oscuro a verde oscuro.

- **Identificación de taninos Precipitación con gelatina 1%:** En un tubo de ensayo se agregó 2ml de extracto etanólico, añada 3 gotas de solución de gelatina al 1 % que contiene NaCl al 10 %, agregándose luego 2 mL de ácido sulfúrico concentrado observándose un precipitado blanco lo cual manifiesta la existencia de taninos.
- **Identificación de flavonoides Ensayo de Shinoda:** En un tubo de ensayo se adiciona 2mL de extracto etanólico, se agrega varias cintas de magnesio y 3 gotas de HCl concentrado (37%) dejando caer lentamente por la pared del tubo de ensayo y se deberá observar la presencia de los colores: naranja, rojo, violeta o rosado.
- **Identificación de Triterpenos Ensayo de Liebermann-Burchard:** En un tubo de ensayo agregar 2mL de extracto etanólico, adicionar 1 mL de cloroformo dejando caer por las paredes del tubo, 1mL de anhídrido acético y dejar reposar en frío. Se deberá observar la coloración roja, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase cuando se añada 1 ó 2 gotas de H₂SO₄.
- **Identificación de Saponinas Ensayo de Espuma:** En un tubo de ensayo, agregar 2 mL de extracto etanólico, adicionar agua caliente (40°C), dejar reposar por 15 minutos a 30 minutos y luego agitar manualmente durante 2 minutos. Se deberá observar la presencia de espuma.

TABLA 7. Reactivos utilizados en la prueba de coloración

Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva
CARBOHIDRATOS	Fehling A y Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo
AZUCARES	Mollish	Anillo azulado
ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco
	Dragendorff	Precipitado rojo o naranja
	Sonneschein	Precipitado naranja
	Bertrand	Coloración rosa
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde
TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco
FLAVONOIDES	Shinoda	Flavanoles: Rojo a magenta
TRITERPENOS	Lieberman – Burchardt	Coloración Verde
SAPONINAS	H ₂ O	Formación de espumas

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Figura 11. Reactivos utilizados

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Se utilizó el extracto etanólico de ambas plantas *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), lo cual tuvo como objetivo identificar metabolitos secundarios que implican reacciones de caracterización química, de coloración y precipitado. Se pudieron realizar la identificación de grupos fitoquímicos presentes en las plantas como se presenta en la figura siguiente.

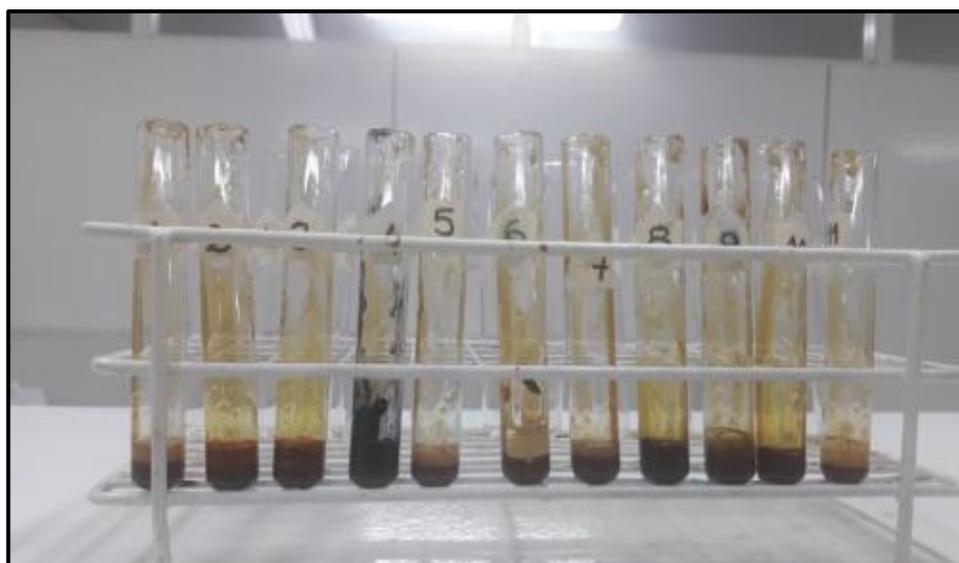


Figura 12. Resultado de la marcha fitoquímica
Fuente: Elaboración propia, 2019.

Leyenda:

- Tubo 1.** Carbohidratos: Fehling A y Fehling B
- Tubo 2.** Azucares: Mollish
- Tubo 3.** Alcaloides: Mayer
- Tubo 4.** Alcaloides: Dragendorff
- Tubo 5.** Alcaloides: Sonneschein
- Tubo 6.** Alcaloides: Bertrand
- Tubo 7.** Compuestos Fenólicos: FeCl_3
- Tubo 8.** Taninos: Gelatina 1%
- Tubo 9.** Flavonoides: Shinoda
- Tubo 10.** Triterpenos: Lieberman – Burchardt
- Tubo 11.** Saponinas: H_2O

3.6.5 Prueba de solubilidad del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)



Figura 13. Prueba de solubilidad
Fuente: Elaboración propia, 2019.

- Se añadió a cada tubo de ensayo 1 ml de cada solvente a analizar y se da movimientos circulares hasta observar un resultado.
- Se realizó con los siguientes solventes: acetato de etilo, ciclohexano, metanol, butanol, éter de petróleo, etanol y agua destilada.

Esta prueba realizada tuvo como objetivo determinar y observar la polaridad o apolaridad de los metabolitos secundarios que se encuentren en los extractos. De esta forma saber en cual puede analizarse los metabolitos.

3.6.6 Procedimiento del Análisis Microbiológico

3.6.6.1 Obtención de las muestras biológicas

Las muestras biológicas fueron obtenidas en el Laboratorio Microbiológico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos el cual consta de bacterias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 con su respectivo certificado. (Ver anexo N°3).

3.6.6.2 Fase Pre- analítica

1. Preparación de materiales

- Las placas Petri fueron envueltas en papel Kraft esterilizándose por calor seco en una estufa a 180°C por 2 horas.
- Las puntas para las micropipetas, los viales de vidrio y los tubos con tapa rosca se esterizaron con calor húmedo en autoclave a 121°C y 15 lb/pg2 durante 15 minutos.

2. Preparación de los Medios de Cultivo

- Se preparó 10 mL de caldo BHI según las instrucciones del fabricante (37 gramos para 1 litro de agua destilada) en un tubo de ensayo y se esterilizó en autoclave.
- Se preparó 50mL de agar Cerebro Corazón para la fase de activación según las instrucciones del fabricante (52 gramos para 1 litro de agua destilada) en un frasco de vidrio y se esterilizó en autoclave. El agar ya esterilizado se enfrió en baño maría a 45-50°C y se vertió en placas petri estériles.
- Se preparó 300mL de agar Cerebro Corazón para la fase analítica en un frasco de vidrio según las reglas del fabricante (52 gramos para 1 litro de agua destilada). Se autoclavó a 121°C y 15 lb/pg2 por un periodo de 15 minutos, después se colocó a baño maría a 45 - 50°C. Una vez llevado a temperatura ambiente se vertió la mezcla fresca y tibia a placas petri de vidrio estériles, para brindar un fondo simular de por lo menos 4 mm, correspondiendo a 25-30 ml para placas de 90 mm de diámetro. El agar ya plaqueado se solidifico a temperatura ambiente. El pH de cada lote de agar Cerebro Corazón debe poseer un pH entre 7,0-7,6. Esta medida puede realizarse introduciendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.
- Se preparó 50mL de suero fisiológico estéril, para ello se pesó 900mg de cloruro de sodio grado bacteriológico y se completó con agua destilada hasta un volumen de 10mL, se esterilizó en

autoclave. Luego se añadió volúmenes de 10mL a 2 tubos estériles.

3. Activación de la Cepa

- La cepa se encontraba refrigerada entre 4-8°C en una placa con agar Cerebro Corazón.
- Se tomó una colonia con el asa bacteriológica y se sembró en un tubo con caldo BHI estéril llevándose a la incubadora a 37°C por 24 horas.
- La turbidez demostró el crecimiento de las cepas. Se sembró el caldo BHI a placas con agar Cerebro Corazón. Se llevó a la incubadora a 37°C por 24 horas.

4. Preparación de las Muestras

Los extractos se trabajaron a 4 concentraciones: 100%, 75%, 50% y 25%. Para las diluciones a partir de los extractos se utilizó agua destilada y estas disoluciones fueron hechas de la siguiente manera:

- 100%: se colocó 2mL del extracto en un vial de vidrio.
- 75%: se colocó 1.5mL del extracto en un vial de vidrio y se añadió 0.5mL de agua destilada.
- 50%: se colocó 1mL del extracto en un vial de vidrio y se agregó 1mL de agua destilada.
- 25%: se colocó 0.5mL del extracto en un vial de vidrio y se agregó 1.5mL de agua destilada

3.6.6.3 Fase Analítica

1. Preparación del Inóculo

- Tomar una cantidad de colonias puras de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y diluir en un tubo de ensayo con 10 mL de suero fisiológico estéril de forma tal que la solución que resulte tenga una turbidez correspondiente al tubo N°1 de la escala de MacFarland que tiene una concentración de 3×10^8 UFC/mL.

- A partir de la última solución se hicieron diluciones de 1 en 3, tomándose 3 mL y se diluyéndose a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en tubos con tapa rosca. Las soluciones resultantes tuvieron una concentración de 1×10^8 UFC/mL.

2. Inoculación de las Placas

- Se añadió 100 uL del inóculo bacteriano preparado 1×10^8 UFC/mL. A todas las placas con agar Cerebro Corazón y con asistencia de una espátula de Drigalsky se esparcieron los inóculos en todas las placas de tal forma que se obtenga un crecimiento homogéneo, para ello se deslizó el asa en la placa paralelamente y bien compacta alcanzando toda la superficie de esta.
- Repetir el proceso rotando la placa a 60° dos veces.
- Sembrar las placas de borde de forma cuidadosa para no tener contratiempo a la hora de realizar las lecturas.
- Secar de 3 a 5 minutos antes de hacer los pocillos.

3. Formación de los pocillos

- Se esterilizó el sacabocados con alcohol y se flameó en el mechero, luego con mucho cuidado se hizo los pocillos, se realizaron tres por placa.
- Los pocillos tienen que hallarse a más de 15 mm del borde de la placa y repartirse de manera que no haya superposición de los halos de inhibición.

4. Sembrado de las muestras y controles

- Se utilizaron 36 placas para las diluciones de los extractos, 3 placas por muestra de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* (Romero).
- Cada dilución se sembró por tres veces agregando 40uL en cada pocillo.
- Se utilizo agua destilada estéril como control negativo o muestra blanco sembrándose 40uL por triplicado.

- Se utilizó una solución de Ciprofloxacino equivalente a 0.125mg/mL como control positivo sembrándose 40uL por tres veces.

5. Incubación

- Las 36 placas de las soluciones de las muestras y los controles fueron llevados a una incubadora a 37°C durante 24 horas.

3.6.6.4 Fase Post analítica

1. Medición de halos

Luego de 18 a 24 horas de incubación, se examinó placa por placa para su lectura. Las zonas de inhibición de respuesta fueron igualmente circulares en una capa homogénea de incremento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa se midieron en milímetros cruzando por el centro de cada pocillo. Se midió por triplicado para cada pocillo con un vernier digital que mide hasta centésima de milímetro. Los valores de las medidas por triplicado se promediaron redondeándose para reportarlo como un número natural.

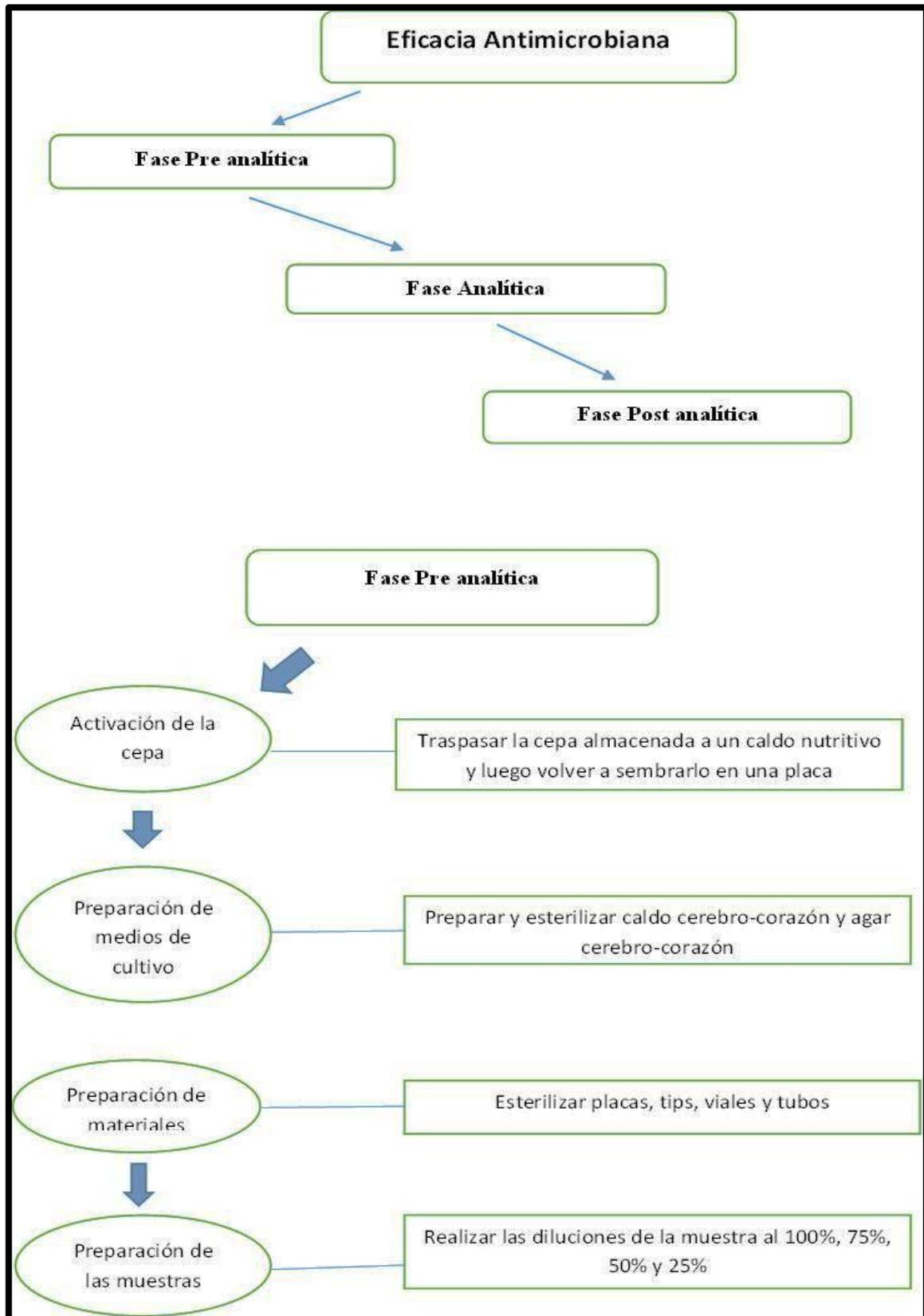


Figura 14. Fase Pre- analítica del tratamiento microbiológico en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fuente: Elaboración propia, 2019

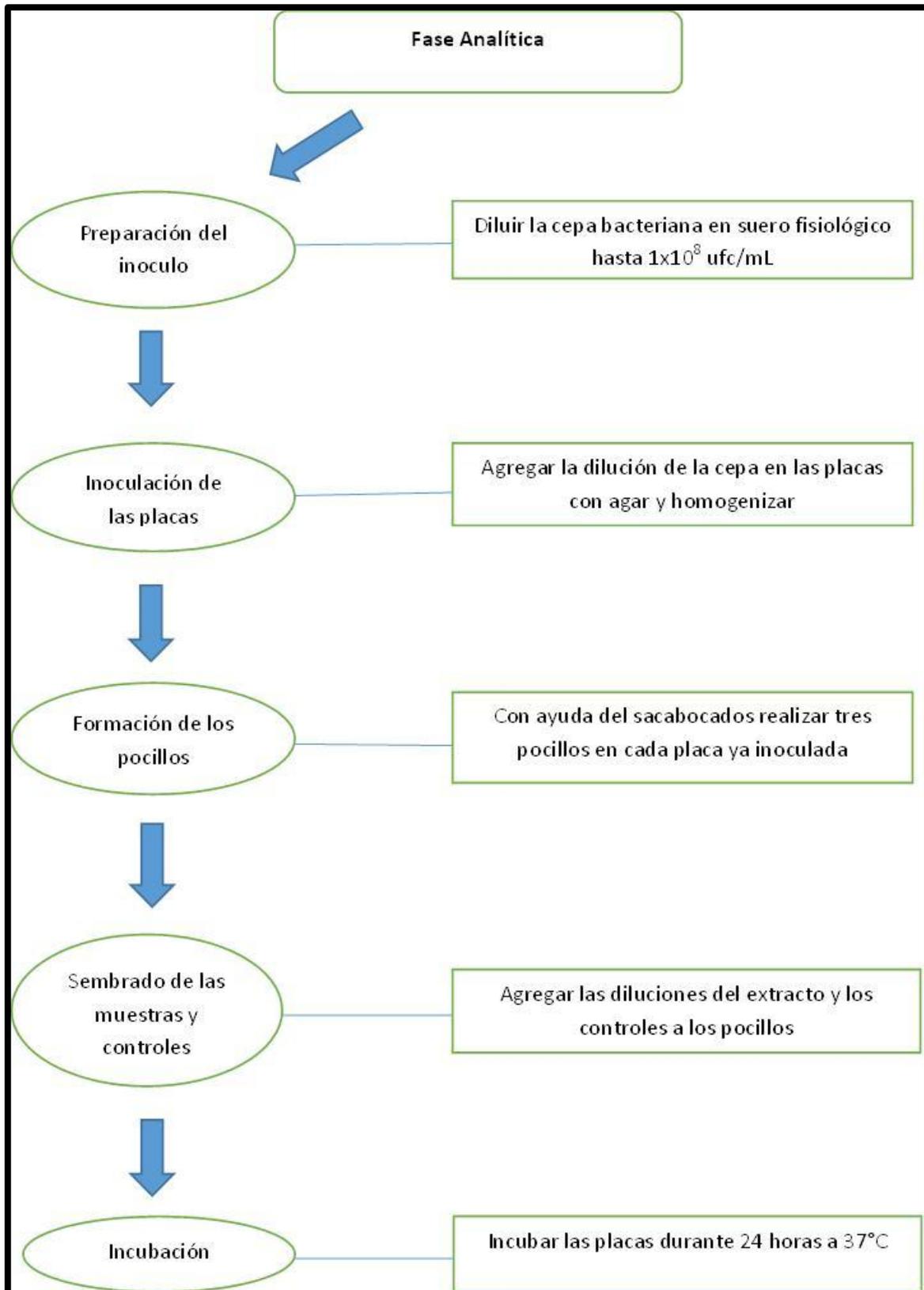


Figura 15. Fase Analítica del tratamiento microbiológico en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fuente: elaboración propia, 2019.



Figura 16. Fase Post analítica del tratamiento microbiológico en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fuente: elaboración propia, 2019.

TABLA 8. Cronograma del tiempo de activación de la cepa

Día 1	Día 2	Día 3		Día 4
Activación de la cepa		Por la mañana	Por la tarde	Por la tarde
Del agar a un caldo nutritivo	Del caldo a un nuevo agar	Preparación de medios de cultivo	Preparación del inóculo	Medición de halos de inhibición
		Preparación de materiales	Inoculación de las placas	Reporte de resultados
		Preparación de las muestras	Formación de los pocillos	
			Sembrado de las muestras y controles	
			Incubación	

Fuente: Elaboración propia, 2019.

3.7. Técnica de Procesamiento de datos

El análisis estadístico se realizó por medio del método de varianza ANOVA mediante el Test de Dunnett.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Resultados de la investigación

4.1.1. Marcha Fitoquímica

Para la identificar metabolitos secundarios se propuso un análisis de indicadores por aplicación de reactivos de identificación, donde el cambio de características, como cambio de color, incremento del diámetro de la muestra o presencias de componentes como la oxidación, cuyos resultados se midieron en base a cuatro niveles de presencia o cambio, siendo el nivel (+++): la presencia de metabolitos en un nivel alto, respectivamente.

TABLA 9. Resultados del Análisis fitoquímico *Artemisia absinthium* L. "Ajenjo".

Concentración (mg/mL) del extracto:				
Tubo	Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva	Resultado
1	CARBOHIDRATOS	Fehling A y Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo	++
2	AZUCARES	Mollish	Anillo azulado	-
3	ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco	+++
4		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	+++
5		Sonneschein	Precipitado naranja	-
6		Bertrand	Coloración rosa	-
7	COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde	++
8	TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco	++
9	FLAVONOIDES	Shinoda	Flavanoles: Rojo a magenta	+++
10	TRITERPENOS	Lieberman – Burchardt	Coloración Verde	+
11	SAPONINAS	H ₂ O	Formación de espumas	+

Leyenda:

(-) : La coloración o precipitado no se evidencia.

(++) : La coloración o precipitado es moderada.

(+) : La coloración o precipitado es leve.

(+++): La coloración o precipitado es total

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Los metabolitos secundarios con mayor presencia identificados en *Artemisia absinthium* L. “Ajenjo”, fueron: los flavonoides y alcaloides, los cuales presentaron un nivel de presencia alto (+++).

TABLA 10. Resultados del Análisis fitoquímico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”.

Concentración (mg/mL) del extracto:				
Nº	Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva	Resultado
	CARBOHIDRATOS	Fehling A y Fehling B	Precipitado anaranjado ladrillo	+
	AZUCARES	Mollish	Anillo azulado	-
	ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco	+
		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	+
		Sonneschein	Precipitado naranja	-
		Bertrand	Coloración rosa	-
	COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde	+++
	TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco	+++
	FLAVONOIDES	Shinoda	Flavonoles: Rojo a magenta	+++
	TRITERPENOS	Lieberman – Burchardt	Coloración Verde	++
	SAPONINAS	H ₂ O	Formación de espumas	+++

Leyenda:

(-) : La coloración o precipitado no se evidencia. (++) : La coloración o precipitado es moderada.
 (+) : La coloración o precipitado es leve. (+++): La coloración o precipitado es total

Fuente: Elaboración propia, 2019.

En cuanto a los metabolitos secundarios encontrados en el Romero están: compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y saponinas, los cuales presentaron un nivel de presencia alto (++ +).

4.1.2. Prueba de Solubilidad

Se realizó a los extractos Etanólicos de *Artemisia absinthium* L. (*ajenjo*) y *Rosmarinus Officinalis* L. (*Romero*) obteniendo como resultados positivos en etanol y agua.

TABLA 11. Resultados de prueba de solubilidad de *Artemisia absinthium* L. “Ajeno”.

Prueba de solubilidad del extracto etanólico de <i>Artemisia absinthium</i> L. “Ajeno”			
N°	Solventes	Identificación	Resultado
1.	Cloroformo	Insoluble	-
2.	Propanol	Insoluble	-
3.	Etanol 96°	Totalmente soluble	+++
4.	Etanol 70°	Moderadamente Soluble	++
5.	Agua	Moderadamente Soluble	++

Fuente: Elaboración propia, 2019.

TABLA 12. Resultados de prueba de solubilidad *Rosmarinus Officinalis* L. “Romero”.

Prueba de solubilidad del extracto etanólico de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. “Romero”			
N°	Solventes	Identificación	Resultado
1.	Cloroformo	Insoluble	-
2.	Propanol	Insoluble	-
3.	Etanol 96°	Totalmente soluble	+++
4.	Etanol 70°	Moderadamente Soluble	++

Leyenda:

(-) : Insoluble.

(++) : Moderadamente Soluble.

(+) : Soluble.

(+++): Totalmente Soluble.

Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.1.3 Resultados del Análisis Microbiológico

Mediante el método de Kirby-bauer por medio de difusión con pozos se demostró que los extractos etanólicos de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) presentan efecto antibacteriano ante cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

TABLA 13. Resultados del ensayo antibacteriano del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

<i>Artemisia absinthium</i> L. (Ajenjo)						
Pozo N°	25%	50%	75%	100%	Control(+)	Control(-)
	A	B	C	D	E	F
Halos de inhibición (mm)						
1	6,00	7,00	8,00	15,00	25,00	6,00
2	6,00	7,00	8,00	16,00	24,00	6,00
3	6,00	7,00	8,00	15,00	25,00	6,00
1	6,00	6,00	7,00	15,00	25,00	6,00
2	6,00	7,00	8,00	15,00	25,00	6,00
3	6,00	7,00	7,00	16,00	25,00	6,00
1	6,00	7,00	8,00	15,00	24,00	6,00
2	6,00	7,00	8,00	15,00	25,00	6,00
3	6,00	7,00	8,00	16,00	25,00	6,00

Fuente: Elaboración propia, 2019.

*El tamaño de cada disco es de 6mm por ende el reporte de esa medida manifiesta que no hubo halo de inhibición.

Interpretación: En la tabla N°13 esta descrito los valores en mm del grado de inhibición de cada placa con *Streptococcus mutans* ATCC 25175, donde se evidencia que en el grupo control negativo (Agua destilada estéril) la medida mínima fue 6 mm como referencia el cual indica que no hubo halo de inhibición, en el grupo control positivo (Ciprofloxacino) la medida mínima fue 24 mm y la máxima 25 mm de inhibición, en el extracto etanólico de Ajenjo al 100 % la medida mínima fue 13 mm y la máxima 16 mm de inhibición, al 75 % la medida mínima fue 7 mm y la máxima 8 mm de inhibición, al 50 % la medida mínima fue 6

mm y la máxima 7 mm de inhibición y al 25 % la medida fue de 6 mm de inhibición.

TABLA 14. Datos estadísticos descriptivos según los grupos experimentales:

Artemisia absinthium L. (Ajenjo)

	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	95%DEL INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA		MINIMO	MAXIMO
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR		
50%	6,9000	,31623	,10000	6,6738	7,1262	6,00	7,00
75%	7,8000	,42164	,13333	7,4984	8,1016	7,4984	8,1016
100%	15,3000	,48305	,15275	14,9544	15,6456	15,00	16,00
CIPRO	24,8000	,42164	,13333	24,4984	25,1016	24,00	25,00

Fuente: Elaboración propia, 2019.

- a. Halo_inhibición es constante cuando el Grupo = Ext 25%. Se ha omitido.
- b. Halo_inhibición es constante cuando el Grupo = Control. Se ha omitido.

Interpretación: Según los resultados estadísticos cada grupo experimental tuvo una media de: 24,8000 mm para ciprofloxacino, 15,3000 mm para extracto de 100 %, 7,8000 mm para extracto de 75 %, y 6,9000 para 50 %.

TABLA 15. Pruebas de normalidad

	Grupo	Kolmogórov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Halo_inhibición	Ext 50%	,524	10	,000	,366	10	,000
	Ext 75%	,482	10	,000	,509	10	,000
	Ext 100%	,433	10	,000	,594	10	,000
	Ciprofloxacino	,482	10	,000	,509	10	,000

Fuente: Elaboración propia, 2019.

- a. Halo_inhibición es constante cuando el Grupo = Ext 25%. Se ha omitido.
- b. Corrección de significación de Lilliefors
- c. Halo_inhibición es continua cuando el Grupo = Control. Se omite.

TABLA 16. Estadísticos de prueba A y B

	Halo_inhibición
Chi-cuadrado	57,378
Gl	5
Sig. Asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación:
Grupo

Fuente: Elaboración propia, 2019.

TABLA 17. Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Halo_inhibición

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Control	,00000	,15154	1,000	-,3926	,3926
Ext 50%	Control	,90000*	,15154	,000	,5074	1,2926
Ext 75%	Control	1,80000*	,15154	,000	1,4074	2,1926
Ext 100%	Control	9,30000*	,15154	,000	8,9074	9,6926
Ciprofloxacino	Control	18,80000*	,15154	,000	18,4074	19,1926

Fuente: Elaboración propia, 2019.

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

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparándolo con los otros.

TABLA 18. Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Halo_inhibición
T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Ciprofloxacino	-18,80000*	,16600	,000	-19,2202	-18,3798
Ext 50%	Ciprofloxacino	-17,90000*	,16600	,000	-18,3202	-17,4798
Ext 75%	Ciprofloxacino	-17,00000*	,16600	,000	-17,4202	-16,5798
Ext 100%	Ciprofloxacino	-9,50000*	,16600	,000	-9,9202	-9,0798

Fuente: Elaboración propia, 2019.

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

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, comparándolo con los otros.

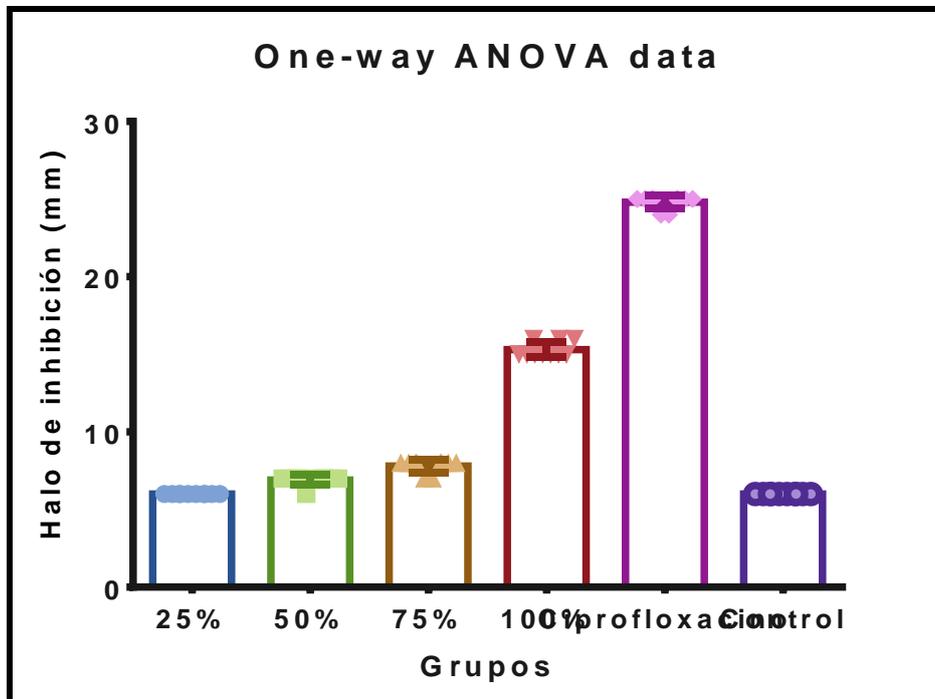


Figura 17.. Comparación de los diferentes grupos experimentales: "Ajenjo".

De los resultados del ensayo antibacteriano del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) frente a cepas *Streptococcus mutans* Atcc 25175, donde se evidencia una medida en mm de 25 mm en ciprofloxacino, 16 mm en 100 %, 8 mm en 75 %, 7mm en 50 % y 6 mm en 25 % del extracto.

TABLA 19 Resultados del ensayo antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

<i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)						
Pozo N°	25% G	50% H	75% I	100% J	Control(+) K	Control(-)
Halos de inhibición (mm)						
1	9,00	13,00	11,00	13,00	25,00	6,00
2	9,00	12,00	11,00	14,00	25,00	6,00
3	8,00	12,00	10,00	14,00	24,00	6,00
1	9,00	12,00	11,00	14,00	23,00	6,00
2	9,00	13,00	11,00	14,00	24,00	6,00
3	9,00	12,00	11,00	13,00	25,00	6,00
1	9,00	12,00	11,00	13,00	25,00	6,00
2	9,00	12,00	10,00	14,00	25,00	6,00
3	8,00	12,00	11,00	14,00	25,00	6,00

Fuente: Elaboración propia, 2019.

*Cada disco es de 6mm, esa medida significa que no existe halo de inhibición.

Interpretación: En la tabla N°14 se describe los valores en mm del grado de inhibición de cada placa con *Streptococcus mutans* ATCC 25175, donde se evidencia que en el grupo control negativo (Agua destilada estéril) la medida mínima fue 6 mm como referencial, el cual indica que no hubo halo de inhibición, en el grupo control positivo (Ciprofloxacino) la medida mínima fue 23 mm y la máxima 25 mm de inhibición, en el extracto etanólico de Romero al 100 % la medida mínima fue de 13 mm y al máximo 14 mm de inhibición, al 75 % la medida

mínima fue de 10 mm y máximo 11 mm de inhibición, al 50 % la medida mínima fue de 12 mm y máximo 13 mm de inhibición y al 25 % la medida mínima fue de 8 mm y máximo 9 mm de inhibición.

TABLA 20. Datos estadísticos descriptivos según los grupos experimentales:

Romero

	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	95%DEL INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA		MINIMO	MAXIMO
				LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR		
25%	8,8000	,42164	,13333	8,8333	9,0000	8,0	9,0
50%	12,3000	,48305	,15275	11,9544	12,6456	12,00	13,00
75%	10,8000	,42164	,13333	10,8333	11,1016	10,00	11,00
100%	13,7000	,48305	,15275	13,3544	14,0456	13,00	14,00
CIPRO	24,5000	,70711	,22361	23,9942	25,0058	23,00	25,00

Fuente, elaboración propia, 2019.

a. Halo_inhibición es constante cuando Grupo = Control. Se ha omitido.

Según los resultados estadístico cada grupo experimental tuvo una media de: 24,5000 mm para ciprofloxacino, 13,7000 m para extracto de 100 %, 10,8000 mm para extracto de 75 %, y 12,3000 para 50 % y 8.800 para 25 % de concentración de extracto respectivamente.

TABLA 21. Pruebas de normalidad

	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Halo_inhibición	Ext 25%	,482	10	,000	,509	10	,000
	Ext 50%	,433	10	,000	,594	10	,000
	Ext 75%	,482	10	,000	,509	10	,000
	Ext 100%	,433	10	,000	,594	10	,000
	Ciprofloxacino	,360	10	,001	,731	10	,002

Fuente: Elaboración propia, 2019.

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. Halo_inhibición es constante cuando el Grupo = Control. Se ha omite.

TABLA 22. Estadísticas de prueba a b

	Halo_inhibición
Chi-cuadrado	57,934
Gl	5
Sig. Asintótica	,000

Fuente: Elaboración propia, 2019.

- a. Prueba de Kruskal Wallis
- b. Variable de agrupación: Grupo

TABLA 23. Comparaciones múltiples:

Variable dependiente: Halo_inhibición

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Control	2,80000*	,20994	,000	2,2561	3,3439
Ext 50%	Control	6,30000*	,20994	,000	5,7561	6,8439
Ext 75%	Control	4,80000*	,20994	,000	4,2561	5,3439
Ext 100%	Control	7,70000*	,20994	,000	7,1561	8,2439
Ciprofloxacino	Control	18,50000*	,20994	,000	17,9561	19,0439

Fuente: Elaboración propia, 2019

- *. La diferencia de medias es de significancia en el nivel 0.05.
- a. Las pruebas t de Dunnett operan un grupo como un control, comparándose con los otros.

TABLA 24. Comparaciones múltiples:

Variable dependiente: Halo_inhibición T de Dunnett (bilateral).

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Ciprofloxacino	-15,70000*	,22998	,000	-16,2821	-15,1179
Ext 50%	Ciprofloxacino	-12,20000*	,22998	,000	-12,7821	-11,6179
Ext 75%	Ciprofloxacino	-13,70000*	,22998	,000	-14,2821	-13,1179
Ext 100%	Ciprofloxacino	-10,80000*	,22998	,000	-11,3821	-10,2179

Fuente: Elaboración propia, 2019.

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

a. Las pruebas t de Dunnett manejan un grupo como un control, y comparándolo con los otros.

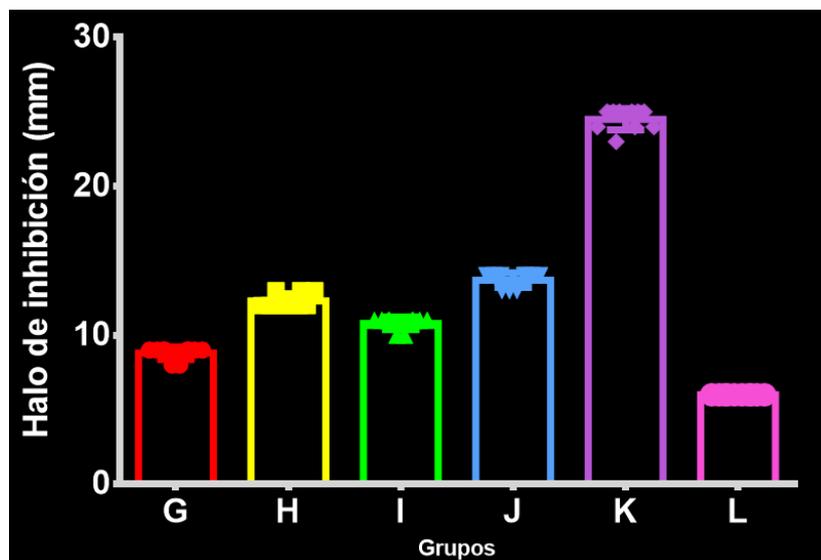


Figura 18. Comparación de los diferentes grupos experimentales: "Romero".

Fuente: Elaboración propia, 2019.

De los resultados del ensayo antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175 donde:

G: Extracto 25 %,

H: Extracto 50 %,

I: Extracto 75 %,

J: Extracto 100 %,

K: Ciprofloxacino y

L: Control.

En donde se evidencia una medida de 25 mm en ciprofloxacino, 14 mm en 100 %, 11 mm en 75 %, 13 mm en 50 % y 9 mm en 25 % de concentración de extracto de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) respectivamente.

4. Contrastación de Hipótesis

- Hipótesis general

TABLA 25. Comparaciones múltiples por el test de Dunnett entre los extractos de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Comparación entre los grupos experimentales contra el control negativo

Variable dependiente: Halo_inhibición
T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Control	,00000	,15154	1,000	-,3926	,3926
Ext 50%	Control	,90000*	,15154	,000	,5074	1,2926
Ext 75%	Control	1,80000*	,15154	,000	1,4074	2,1926
Ext 100%	Control	9,30000*	,15154	,000	8,9074	9,6926
Ciprofloxacino	Control	18,80000*	,15154	,000	18,4074	19,1926

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

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparándolo con los otros.

Por medio de comparaciones múltiples por el test de Dunnett (tabla 2) se determinó que los extractos de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) al 50, 75 y 100 % presentaron halos de inhibición con una diferencia estadísticamente significativa comparado con el control ante cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

TABLA 26. Comparaciones múltiples por el test de Dunnett entre los extractos de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Comparación entre los grupos experimentales contra el control negativo.

Variable dependiente: Halo_inhibición

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Control	2,80000*	,20994	,000	2,2561	3,3439
Ext 50%	Control	6,30000*	,20994	,000	5,7561	6,8439
Ext 75%	Control	4,80000*	,20994	,000	4,2561	5,3439
Ext 100%	Control	7,70000*	,20994	,000	7,1561	8,2439
Ciprofloxacino	Control	18,50000*	,20994	,000	17,9561	19,0439

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

a. Las pruebas t de Dunnett operan un grupo como un control, comparándolo con los otros.

Por medio de comparaciones múltiples por el test de Dunnett (tabla 3) se halló que los extractos de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) al 25, 50, 75 y 100 % presentaron halos de inhibición con una diferencia estadísticamente significativa comparado con el control frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

H₁: El extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) posee efecto antibacteriano in vitro frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

H₀: El extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) no posee efecto antibacteriano in vitro frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

La hipótesis general se contrasta en función de los resultados obtenidos para la constatación de las hipótesis específicas.

Decisión: Obteniéndose resultados significativos con cada uno de los extractos *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero), viendo que los dos poseen actividad bacteriana in vitro frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se rechaza la hipótesis nula de la hipótesis general de estudio.

- **Hipótesis específica 1**

H₁: Sí existen metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).

- **Hipótesis específica 2**

H₁: Sí existe una concentración óptima del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que genera efecto antibacteriano, in vitro, en cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

TABLA 27 Comparaciones múltiples *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) con Ciprofloxacino

Variable dependiente: Halo_inhibición

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Ciprofloxacino	-18,80000*	,16600	,000	-19,2202	-18,3798
Ext 50%	Ciprofloxacino	-17,90000*	,16600	,000	-18,3202	-17,4798
Ext 75%	Ciprofloxacino	-17,00000*	,16600	,000	-17,4202	-16,5798
Ext 100%	Ciprofloxacino	-9,50000*	,16600	,000	-9,9202	-9,0798

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

a. Las pruebas t de Dunnett operan un grupo como un control, y luego una comparación de los otros grupos con este.

Por medio de comparaciones múltiples por el test de Dunnett (tabla 4) se determinó que los extractos de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) al 25, 50, 75 y 100 % presentaron halos de inhibición con una diferencia estadísticamente significativa comparado con ciprofloxacino frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

TABLA 28. Comparaciones múltiples *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) con Ciprofloxacino.

Variable dependiente: Halo_inhibición

T de Dunnett (bilateral)^a

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Ext 25%	Ciprofloxacino	-15,70000 *	,22998	,000	-16,2821	-15,1179
Ext 50%	Ciprofloxacino	-12,20000 *	,22998	,000	-12,7821	-11,6179
Ext 75%	Ciprofloxacino	-13,70000 *	,22998	,000	-14,2821	-13,1179
Ext 100%	Ciprofloxacino	-10,80000 *	,22998	,000	-11,3821	-10,2179

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

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Por medio de comparaciones múltiples por el test de Dunnett (tabla 5) se estableció que los extractos de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) al 25, 50, 75 y 100 % presentaron halos de inhibición con una diferencia estadísticamente significativa comparado con ciprofloxacino frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- **Hipótesis específica 3**

H₃: Sí existe efecto antimicrobiano del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con el Ciprofloxacino en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Decisión: Por consiguiente, se rechaza la hipótesis alternativa.

4.2 Discusión de resultados

Los metabolitos secundarios con mayor presencia identificados en el presente estudio con respecto al *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) fueron: los flavonoides y alcaloides, los cuales presentaron un nivel de presencia alto (+++). En cuanto a los metabolitos secundarios encontrados en el *Rosmarinus officinalis* L. (Romero): compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y saponinas, los cuales presentaron un nivel de presencia alto (+++). En la prueba de solubilidad realizada a ambas plantas se obtuvieron los resultados positivos en etanol y agua.

Barrios F. Quispe P, (2017) ⁽¹⁷⁾, en su estudio se determinó el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Artemisia absinthium* L. “Ajenjo” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Contrario de los metabolitos encontrados en la investigación, **Barrios F. Quispe P** revelaron la presencia de taninos condensados, así como la presencia de flavonas. El análisis por cromatografía en capa fina identificó la existencia de taninos con Rf de 0.52 y 0.89.

Por otro lado, en cuanto al análisis microbiológico del Ajenjo resultó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial fue de 6.25 µL/mL, equivalente a 0.63%, la concentración mínima bactericida fue determinada bajo el proceso de siembra en placa, siendo esta de 12.5 µL/mL equivalente a 1.25% del aceite esencial. Finalmente se determinó la sensibilidad bacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en diversas concentraciones que van desde 0.16 hasta el 100% de aceite esencial de *Artemisia absinthium* L “ajenjo”, con halos de inhibición de 3.1 a 19.5 mm a excepción de la concentración de 0.16%, así mismo, no se encontró halos de inhibición en los discos con etanol absoluto, por otro lado al comparar con eritromicina se encontró que ninguna concentración de aceite esencial se iguala a la potencia antibacteriana de la eritromicina debido a que el halo máximo a 100% de aceite esencial fue de 19.5 mm y el de eritromicina de 29.1 mm ⁽¹⁷⁾.

En la tabla N°13 del presente estudio se describe los valores en mm del grado de inhibición de cada placa con *Streptococcus mutans*, donde se evidencia que en el grupo experimental extracto etanólico de ajenojo 100 % la medida mínima fue 13 mm y la máxima 16 mm de inhibición, al 75 % la medida mínima fue 7 mm y la máxima 8 mm de inhibición, al 50 % la medida mínima fue 6 mm y la máxima 7 mm de inhibición y al 25 % la medida fue de 6 mm de inhibición.

Según los resultados estadístico cada grupo experimental tuvo una media de: 24,8000 mm para ciprofloxacino, 15,3000 m para extracto de 100 %, 7,8000 mm para extracto de 75 %, y 6,9000 para 50 %. En los resultados del extracto etanólico de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) frente a cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175 evidencia una medida en mm de 25 en ciprofloxacino, 16 en 100 %, 8 en 75 %, 7 en 50 % y 6 mm en 25 %.

Taylor P. Purca P. (2013) ⁽¹²⁾ en su estudio determinaron la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) en concentrados de: 25 mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml sobre la flora salival y se hizo la comparación con el control positivo la clorhexidina 0,12 % y el negativo con el agua destilada.

Escogieron a 22 personas atendidas en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM, en donde fueron tomadas las muestras de saliva para su evaluación microbiológica. Se planto en medio de cultivo Agar Trypticasa soya, utilizando el método de difusión en vasijas incubándose en 24h y 48h a 37° C. Obteniéndose halos de inhibición de 12,47 mm en promedio para 25 mg/ml, 17 mm para 50 mg/ml, 20,56 para 75 mg/ml, 15,56 para la clorhexidina 0,12 % y 5 mm para el agua destilada. De los resultados se demostró que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*, tiene consecuencias antibacterianas en flora salival ⁽¹²⁾.

En el presente estudio sobre el romero se usaron otras concentraciones de extracto etanólico y el grupo control positivo ha sido ciprofloxacino, en la tabla N°13 se describe los valores en mm del grado de inhibición de cada placa con *Streptococcus mutans* en el presente estudio invitro, donde se evidencia que en el grupo experimental extracto etanólico de romero 50 % la medida fue de 12 mm y máximo 13 mm de inhibición.

Por medio de comparaciones múltiples por el test de Dunnet se determinó que los extractos de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) *Rosmarinus officinales* (Romero) al 25, 50, 75 y 100 % presentaron halos de inhibición con una diferencia estadísticamente significativa comparado con ciprofloxacino frente a cepas *Streptococcus mutans*.

Por otro lado, **Melissa N. Gutiérrez M. (2013)**⁽¹⁵⁾ en su estudio emplearon cuatro concentraciones de 250: 500: 750 y 1000 mg/ml de extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. y como control de inhibición: penicilina. A fin de calcular la reacción del extracto en el microorganismo se usó el método de Kirby Bauer variado, plantando un inóculo generalizado con el patrón de turbiedad 0.5 de Nefelómetro de McFarland en placas de Agar Mueller Hinton por la técnica de siembra de superficie. Obteniendo como resultado que el promedio de los halos de inhibición de los cultivos de *Streptococcus B-hemolítico* conseguido en diversas concentraciones ensayadas, aumenta de 22,3 a 37,3 mm. Cuanto mayor es la concentración de la esencia hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" en el rango de 250 a 1000 mg/ml, se incrementa el diámetro de halo de inhibición de *Streptococcus B-hemolítico* estos resultados muestran índices muy distintos al presente estudio realizado ya que se utilizó diferentes concentraciones y la procedencia del Romero fue de otra región, o el *Streptococcus B-hemolítico* es más sensible a los metabolitos expuestos⁽¹⁵⁾.

Sin embargo, **Loja M. (2017)**⁽¹⁶⁾ en su investigación la cual hizo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Señor de Sipán. La cantidad de muestra a utilizar fue de 100 uL de colutorio a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus*

officinalis L. y una solución bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* en concentrado de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Se utilizó 2 métodos, el de difusión en placa que comprobó la medida antibacteriana del colutorio y el de microdilución en microplaca que estableció la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Teniendo como resultado que el colutorio realizado a base de extracto alcohólico de *R. officinalis* posee un resultado antibacteriano in vitro en comparación a *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* sobrepasando al control positivo Gluconato de clorhexidina al 0,12% con un 30% de inhibición. Además, se determinó la CMI y la CMB del colutorio realizado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* sobre *Streptococcus mutans* de 2 mg/mL y 5 mg/mL al respecto ⁽¹⁶⁾.

Según los resultados estadístico del presente estudio cada grupo experimental tuvo una media de: 24,5000 mm para ciprofloxacino, 13,7000 m para extracto de 100 %, 10,8000 mm para extracto de 75 %, y 12,3000 para 50 % y 8.800 para 25 % de concentración de extracto respectivamente. Se evidenció una medida de 25 mm en ciprofloxacino, 14 mm en 100 %, 11 mm en 75 %, 13 mm en 50 % y 9 mm en 25 % de concentración de extracto de Romero respectivamente lo que indica que tiene efecto antibacteriano considerable pero no es similar al grupo control positivo Ciprofloxacino ya que este medicamento presentó un grado mayor de inhibición en dicha bacteria.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. Existen metabolitos secundarios de extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) como los flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, taninos y saponinas.
2. Se comprobó que la concentración óptima del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que genere efecto antibacteriano, in vitro, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es de 75 % y 100 % ya que se demostró que al 50 y 25 % los halos de inhibición son inferiores a 10 mm por lo que no se considera efecto antibacteriano a esas concentraciones.
3. Se estableció el efecto antimicrobiano del extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con el ciprofloxacino en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los extractos presentaron halos de inhibición inferiores en 75% y 100% a las del medicamento con una diferencia considerable en forma estadística. Por lo que se concluye que el efecto del Ciprofloxacino es mayor al de los extractos.

5.2. Recomendaciones

1. Se recomienda realizar nuevos estudios de ambas plantas con distintos métodos microbiológicos para confirmar los resultados de la investigación encontrados y así contribuir a una alternativa de tratamiento para las infecciones causadas por *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en la población.
2. Se recomienda cuantificar los metabolitos secundarios de extracto etanólico del *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) que generen efecto antibacteriano tales como los flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos, taninos y saponinas para tener mayor sustento científico en base a las dos plantas estudiadas.
3. Se recomienda utilizar diferentes concentraciones en el estudio de las dos plantas, así mismo evidenciar su efecto antibacteriano sinérgico in vitro, frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Referencias Bibliográficas

1. Rodríguez Lira G. Determinación del efecto antibacteriano in vitro de la rivilina humilis I. (flor blanca) sobre el crecimiento de Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa. [Online].; 2013. Acceso 11 de marzo de 2019 [Obtenida de: <http://tesis.ucsm.edu.pe/reposito>]. Disponible en: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/handle/UCSM/3838>.
2. K. A. Efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de Muehlenbeckia volcánica (Benth) Endlicher (mullaca) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas Perú. [Online].; 2016.. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/5978/1/Arauco_pk.pdf.
3. De La Cruz J. Plantas medicinales altoandinas de las zonas de Ayacucho Huancavelica. Tesis. Ayacucho, Perú: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.
4. Cornejo V. Estudio Morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho. Ayacucho. Perú: Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
5. Levy S. The antibiotic paradox. 2nd ed. Cambridge (MA): Perseus Publishing; 2002.
6. Organización Mundial De La Salud. Documentos de medicina. [Online].; 2013.. Disponible en: <Http://Apps.Who.Int/Medicinedocs/Documents/S21201es/S21201es.Pdf>.
7. Skandamis P, Koutsoumanis K, Fasseas K, Nychas G. Inhibition of oregano essential oil and EDTA on E. coli O157:H7. Ital J Food Sci. 2001; 13(1): p. 65-75.

8. Escribano M, Matesanz PB. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 2005; 17(2): p. 79-87.
9. Cedric F, al. e. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Albizia adianthifolia*, *alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* and three other Cameroonian plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. revised 16 January 2016; accepted 19 January 2016.
10. Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú Cusco -Perú: Ed. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas; 1999.
11. col. LEy. Sinergismo entre ajoeno y Ketoconazol en aislamiento de *Microsporum canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF). *Revista Iberoamericana Micologica*. 2008; 25: p. 157-162.
12. Taylor P, Purca P. Efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival..
13. San Román Suárez IdM. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal..
14. Dalguerre V. Evaluacion de formularios naturales a base de ajeno (*Artemisia absinthium*), para el control de Pulgon Verde (*Macrosiphum* sp.) en lechuga(*Lactuca sativa*)..
15. Melissa N, Gutierrez M. Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. romero, sobre la viabilidad de *Streptococcus* B-hemolítico in vitro..
16. Loja M. Efecto antibacteriano in vitro de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Streptococcus mutans*

Y *Enterococcus faecalis*..

17. Barrios A FdL, Quispe H P. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Artemisia absinthium* L. sobre *Staphylococcus aureus*..
18. Marcela A, Jane H, Paulo E, Sérgio C, Arnaldo C, Alessandra T. Dentifrice Containing Extract of *Rosmarinus officinalis* Linn.: An Antimicrobial Evaluation. *Braz. Dent. J.* 2016; 27(5).
19. Andrea , Azuero , Carmita , Jaramillo D, Martin S, Haydelba , et al. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral. Ecuador.
20. Lozada M. Estudio fotoquímico y evaluación de actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615 de extractos apolares (Cloroformo –Hexano). [Online].; 2016.. Disponible en: <https://www.dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13534>.
21. Lizcano A, al. e. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos Etanolicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles Ferruginea*, *Myrcinthes Rhopaloides* y *Passiflora Manicata* frente a microorganismos Patógenos y Fitopatógeno. [Online]; 2008. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>.
22. Línea y Salud. Ajento y Romero. [Online]; 2014. Acceso 14 de agosto de 2018. Disponible en: <https://www.lineaysalud.com/wpcontent/uploads/2014/11/jengibre4.png>.
23. Sánchez G. Niveles de *streptococcus mutans* y *lactobacillus*. *Boletín de la asociación argentina de odontología para niños.* 2003; 31 (4).
24. Cáceres A. *Plantas medicinales* Barcelona – España: Labor; 1995.
25. *Pharmacopeia E. Council of Europe : Wormwood - Absinthii herba*; 2008.

26. Alosno J. Tratado de Fitomedicina Bases Clínicas y Farmacológicas Buenos Aires- Argentina: ISIS ediciones SRL; 1998.
27. Giugnolinini. citado en De Mastro y Ruta, 2004; Roselló et al., 2006; Zaouali et al., 2010..
28. Fuentes V, Granada M, Lesmes C, C R. Estudios fenológicos en plantas medicinales. Rev. Cubana Plant Med.. 2000; 5(3).
29. Avila R, al e. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. Puebla, Pue. 72420. México: Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 14 Sur y Av. San Claudio, Edificio 105E Ciudad Universitaria.
30. Musa O, Chalchat J. Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. International Journal of Food Science and Nutrition. 2008; 59(7): p. 691-698.
31. Curioni A, Arizio O. Plantas aromáticas y medicinales labiadas Buenos Aires: Editorial hemisferio sur; 2006.
32. Negroni M. Microbiología Estomatológica Argentina: Editorial Médico Panamericana Argentina; 1999.
33. Liébana J. Microbiología Oral. 1st ed. España: Editorial Interamericana Mc. Graw Hill; 1995.
34. Melgar R. Factor Contaminación Temprana del Infante. Revista Gaceta Odontológica. 2000; 2(3): p. 11-14.
35. Marcatoni M, Piovano S, Covianchi A, Garcia M, Soriano G. Comparación de los métodos de cultivo para *Streptococcus* del grupo mutans. Boletín de la Asociación Argentina de Odontología para Niños. 1999/2000; 28(4): p. 5-9.
36. Romero Lozano C. Elaboración de macerados y mistelas en especies vegetales disponibles en la provincia de Azuay. Ecuador: Universidad de

Cuenca.

37. López Casamayor E. Estudio Fitoquímico y aproximación Genética en especies de la sección Plinthine del género Arenaria. Tesis. España: Universidad de Granada Departamento de Botánica.
38. Harvey A. Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products. Drug Discovery.

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de Consistencia

TITULO						
"Efecto antibacteriano, in vitro, del extracto etanólico del <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> "						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES		METODOLOGÍA	INSTRUMENTOS
			VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	Observacional	
¿El extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) posee efecto antibacteriano frente a las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ?	Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) frente a las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> .	El extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) posee efecto antibacteriano in vitro frente a las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> .	Extracto Etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	-Metabolitos secundarios - Grado de concentración en mg/Kg - Frecuencia de aplicación - Tiempo de aplicación	TIPO Experimental Transversal	POBLACION <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) Cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Muestra: Extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) 60 placas con cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 -Técnica: Maceración Marcha fitoquímica Método de Difusión en Placa -Instrumento: Ficha validada de recolección de datos Para medición de ambas variables
			PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPOTESIS ESPECÍFICAS	
¿Existe metabolitos secundarios del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	Determinar si existen metabolitos secundarios de extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	Existen metabolitos secundarios del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) que generan efecto antibacteriano, in vitro, en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> .	Efecto Antibacteriano	Halos de inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Cuantitativo – Aplicado	
¿Existirá una concentración óptima del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) que genere efecto antibacteriano, in vitro, en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	Comprobar si existe una concentración óptima del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) que genere efecto antibacteriano, in vitro, en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	Existe una concentración óptima del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) que genera efecto antibacteriano, in vitro, en cepas <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.				
¿Existe efecto antimicrobiano del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) comparado con el Ciprofloxacino en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	Determinar si existe el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) comparado con el Ciprofloxacino en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	Existe efecto antimicrobiano del extracto etanólico de <i>Arthemisia absinthium</i> L. (Ajenjo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero) comparado con el Ciprofloxacino en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.			DISEÑO	
					EXPERIMENTAL	

Anexo 1. Constancia de participación en el proceso microbiológico.

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS (Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA) FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA CENPROFARMA CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA</p>	
---	---	---

EL DIRECTOR DEL CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA:

CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN PROCESO DE ANÁLISIS

A las Srtas. **DEYSI VICTORIA RAMIREZ ILLESCA Y RUTH ROXANA CÁCERES VICENCIO**, quienes fueron partícipes de la realización del análisis de Efecto Antimicrobiano frente a la cepa *Streptococcus Mutans* en sus muestras “*Extracto Etanólico del Artemisia Absinthium L. (Ajenjo)* y *Extracto Etanólico de Rosamarinus Officinalis (Romero)*”, para la implementación de su tesis, en nuestro Laboratorio del **Centro de Control Analítico – CENPROFARMA**

Se expide el presente documento a solicitud de las interesadas, para los fines que estimen por conveniente.

Lima, 25 de Enero del 2019


.....
Q.F. Gustavo Guerra Brizuela
Director del Centro de Control Analítico



“FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO”

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

ISO 9001
BUREAU VERITAS
Certification
N° BR233265


BUREAU VERITAS
1828


UKAS
MANAGEMENT
SYSTEMS
908

Anexo 2. Constancia de clasificación taxonómica de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero).


UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL
100 años Museo de Historia Natural UNMSM

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 456-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa), recibida de **Deysi Victoria Ramirez Illesca y Ruth Roxana Cáceres Vicencio**; estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: ***Rosmarinus officinalis* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB-CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

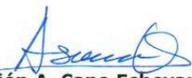
GENERO: *Rosmarinus*

ESPECIE: *Rosmarinus officinalis* L.;

Nombre vulgar: "Romero".
Determinado por: Mg. Asunción Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estimen conveniente.

Lima, 11 de diciembre de 2018


Mag. Asunción A. Cano Echevarría
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/ ddb

Anexo 4. Constancia de clasificación taxonómica de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo)

	UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO	
MUSEO DE HISTORIA NATURAL		
<i>"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"</i>		
CONSTANCIA N° 457-USM-2018		
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>		
<p>La muestra vegetal (tallo, hojas), recibida de Deysi Victoria Ramírez Illesca y Ruth Roxana Cáceres Vicencio; estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: <i>Artemisia absinthium</i> L.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):</p>		
<p>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</p>		
<p>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</p>		
<p>SUB CLASE: ASTERIDAE</p>		
<p>ORDEN: ASTERALES</p>		
<p>FAMILIA: ASTERACEAE</p>		
<p>GENERO: <i>Artemisia</i></p>		
<p>ESPECIE: <i>Artemisia absinthium</i> L</p>		
<p>Nombre vulgar: "Ajenjo" Determinado por: Mag. Hamilton Beltrán Santiago</p>		
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.</p>		
<p>Lima, 10 diciembre de 2018</p>		
		
<p>Mag.  ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)</p>		
<p>ACE/ddb</p>		

Anexo 5. Marcha Fitoquímica



Fotografía 1. Recolección de la muestra

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 2 y 3. Limpieza y selección de las muestras

Fuente: Elaboración propia, 2019.



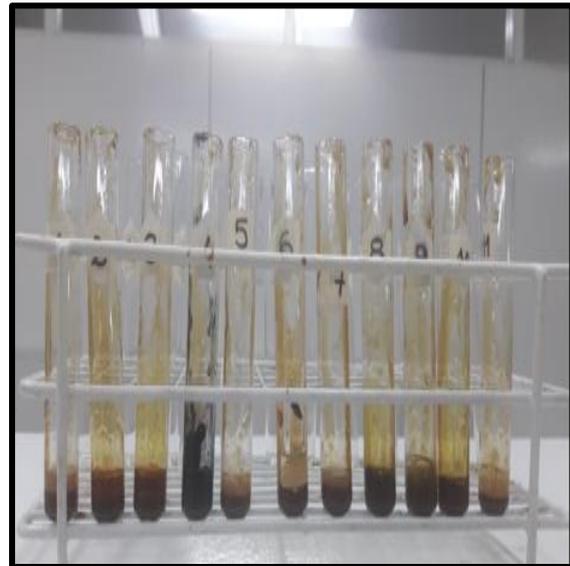
Fotografía 4 y 5. Secado de muestras

Fuente: Elaboración propia, 2019.



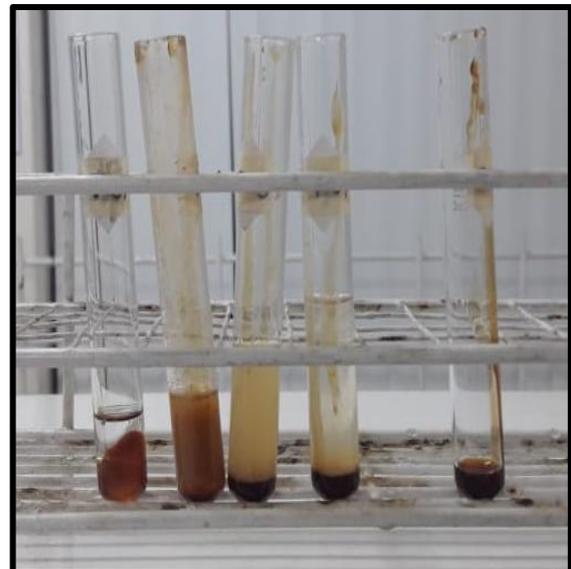
Fotografía 6 y 7. Filtrado y destilación de las muestras

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 8 y 9. Reactivos y marcha fitoquímica realizada a ambas plantas.

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 10 y 11. Prueba de solubilidad realizada a ambas plantas.

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Anexo 6. Procedimiento microbiológico



Fotografía 12 y 13. Activación de la cepa y preparación del medio de cultivo.

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 14 y 15. Preparación de las muestras en diferentes disoluciones 100%, 75%, 50% y 25%

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 16 y 17. Preparación del inoculo e inoculación de las placas

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 18 y 19. Formación de pocillos y sembrado de las muestras y controles

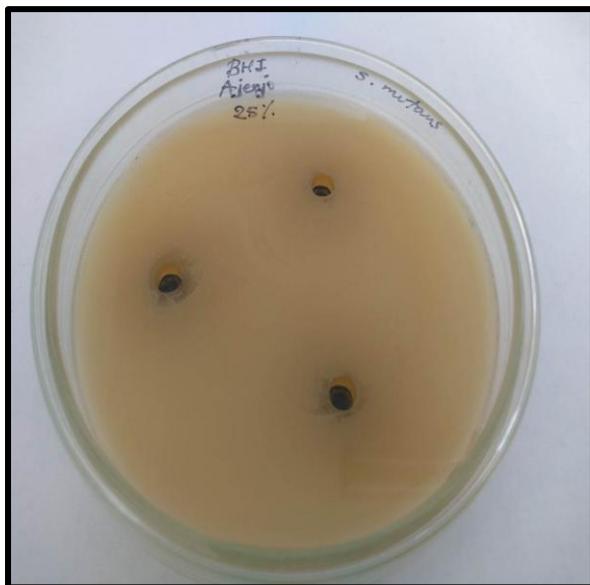
Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 20 y 21. Medición de halos de inhibición con un vernier debidamente calibrado.

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Anexo 7. Resultados microbiológicos obtenidos de análisis de *Arthemisia absinthium* L. (Ajenjo) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Fotografía 22 y 23. Análisis de *Arthemisia absinthium* L. (Ajenjo) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 25%.

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 24 y 25. Análisis de *Arthemisia absinthium* L. (Ajenjo) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 50%.

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 26 y 27. Análisis de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 75%.

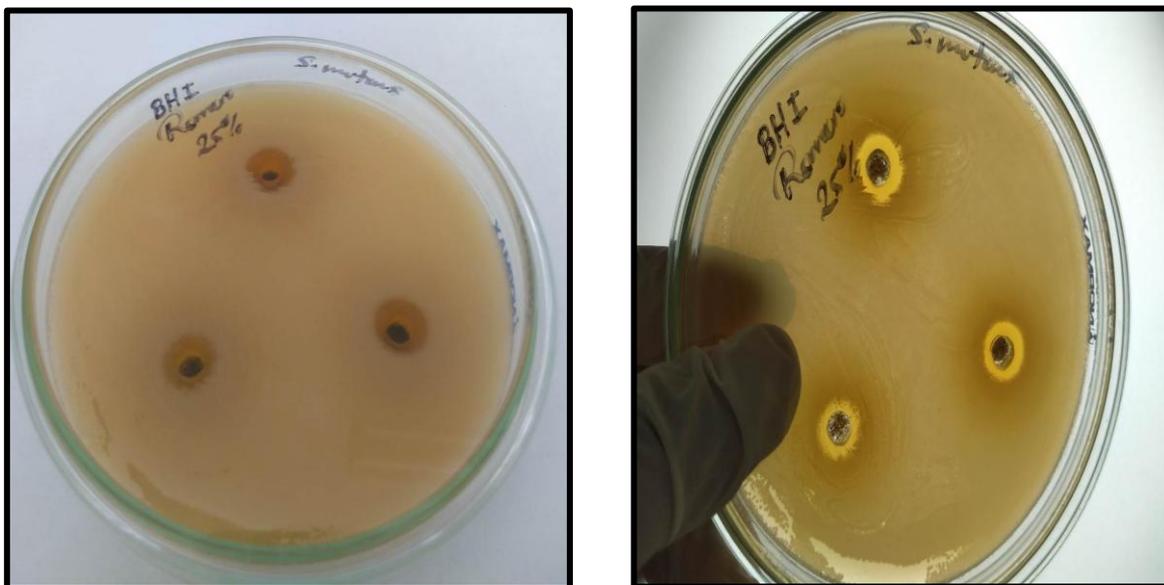
Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 28 y 29. Análisis de *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 100%.

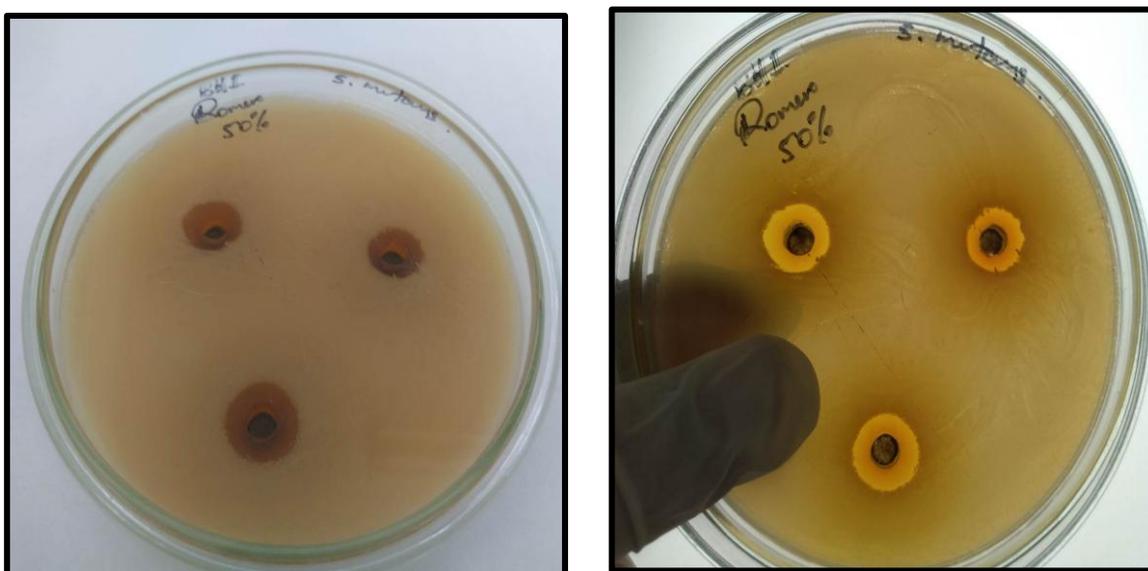
Fuente: Elaboración propia, 2019.

Anexo 3 Resultados microbiológicos obtenidos de análisis de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Fotografía 30 y 31. Análisis de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 25%.

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 32 y 33. Análisis de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 50%.

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 34 y 35. Análisis de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 75%.

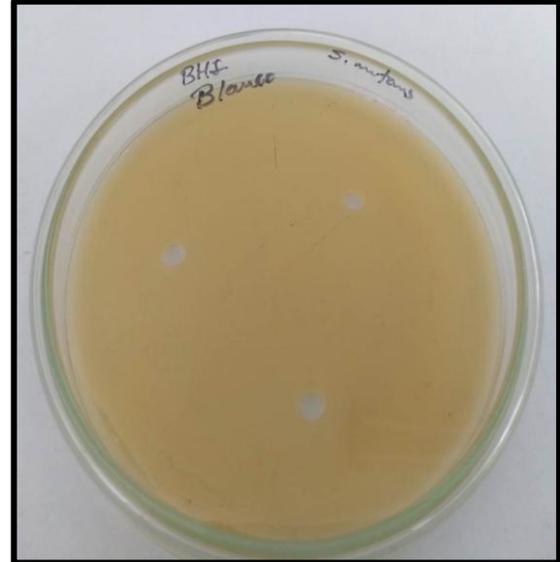
Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 36 y 37. Análisis de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al 100%.

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Anexo 8. Resultados microbiológicos obtenidos de análisis de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Fotografía 38 y 39. Análisis del grupo control blanco en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fuente: Elaboración propia, 2019.



Fotografía 40 y 41. Análisis del grupo control positivo(Ciprofloxacino) en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fuente: Elaboración propia, 2019.

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

PROCEDIMIENTO MICROBIOLÓGICO

"EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Artemisia absinthium* L. (Ajenjo) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) EN CEPAS DE *Streptococcus mutans*"

Artemisia absinthium L. (Ajenjo)

Pozo N°	25 %	50 %	75 %	100 %	Control(+)	Control(-)
---------	------	------	------	-------	------------	------------

Halos de inhibición (mm)

1						
2						
3						
1						
2						
3						
1						
2						
3						

Rosmarinus officinalis L. (Romero)

Pozo N°	25 %	50 %	75 %	100 %	Control(+)	Control(-)
---------	------	------	------	-------	------------	------------

Halos de inhibición (mm)

1						
2						
3						
1						
2						
3						
1						
2						
3						

Anexo 4. Ficha de recolección de datos, procedimiento microbiológico

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

MARCHA FITOQUÍMICA

“EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Artemisia absinthium L. (Ajenjo) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)
EN CEPAS DE *Streptococcus mutans*”

Concentración del extracto etanólico:

Nº	Metabolito	Reactivo de Reacción	Reacción Positiva	Resultado
1.	CARBOHIDRATOS	Fehling A y Fehling B	Precipitado amarillado ladrillo	
2.	ALCALOIDES	Mayer	Precipitado blanco	
		Dragendorff	Precipitado rojo o naranja	
		Sommescheli	Precipitado naranja	
		Bertrand	Coloración rosa	
3.	COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde	
4.	TANINOS	Gelatina 1%	Precipitado denso blanco	
5.	FLAVONOIDES	Shinoda	Flavonoles: Rojo a magenta	
6.	TRITERPENOS	Lieberman	Coloración Rojiza	
7.	SAPONINAS	H ₂ O	Formación de espumas	

Legenda:

- (-) : La coloración o precipitado no se evidencia. (++) : La coloración o precipitado es moderada.
(+) : La coloración o precipitado es leve. (+++): La coloración o precipitado es total

Anexo 11. Ficha de prueba de solubilidad

“EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Artemisia absinthium L. (Ajenjo) Y *Rosmarinus officinalis* L. (Romero)
EN CEPAS DE *Streptococcus mutans*”

PRUEBA DE SOLUBILIDAD			
Nº	Solventes	Identificación	Resultado
1.	Cloroformo	Soluble, insoluble, moderadamente soluble, totalmente soluble	
2.	Propanol	Soluble, insoluble, moderadamente soluble, totalmente soluble	
3.	Etanol 96º	Soluble, insoluble, moderadamente soluble, totalmente soluble	
4.	Etanol 70º	Soluble, insoluble, moderadamente soluble, totalmente soluble	
5.	Agua	Soluble, insoluble, moderadamente soluble, totalmente soluble	

Leyenda:

(-) : Insoluble. (++) : Moderadamente Soluble.
(+) : Poco Soluble. (+++) : Totalmente Soluble.

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 75

Puntuación

10-25	No válido, reformular
25-50	No válido, modificar
50-75	Válido, mejorar
75-100	Válido, aplicar



Firma del Experto

08970



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA
FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERTOS

"EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL *ARTHEMISIA ABSINTHUM* L. (AJENJO) Y *ROSMARINUS OFFICINALIS* (ROMERO) EN CEPAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*"

1. DATOS GENERALES

1.1.- Apellido y nombres del experto: Flores Lopez, Oscar B

1.2.- Cargo e institución donde labora: Docente

1.3.- Grado académico: Magister registro colegio profesional 1995

1.4.- Nombre de instrumento y motivo de evaluación: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

1.5.- Autor de instrumento: Cáceres Vicencio Roxana y Ramirez Illesca Deysi

1.6.- Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 10 donde:

1-3.-Muy poco 3-5.-Poco 5-7.-Regular 7-9.-Aceptable 10.-Muy aceptable

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTAJACIÓN												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
1.- Claridad	Está formulado el instrumento con un lenguaje apropiado.													X
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.													X
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.													X
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica.													X
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.													X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para recolectar os datos de marcha fitoquímica y proceso microbiológico del estudio.													X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Fitoquímica, Farmacognosia y microbiología													X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.													X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación													X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.													X
	Total parcial													
	Total													

IL OPINIÓN DE APLICABILIDAD:

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 100



Firma del Experto

Puntuación

10-25	No válido, reformular
25-50	No válido, modificar
50-75	Válido, mejorar
75-100	Válido, aplicar

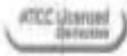
III. PROMEDIO DE VALORACIÓN:.....


Firma del Esperto
Dr. Pablo Jacinto Hernández
COFOL 6484

Puntuación

10-25	No válido, reformular
25-50	No válido, modificar
50-75	Válido, mejorar
75-100	Válido, aplicar

Anexo 13. Certificado de la cepa de Streptococcus mutans ATCC 25175

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0200 Lot Number: 200-23 Reference Number: ATCC® 25175™ ¹ Purity: > 99.9% of Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/12/09 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanish Release Date: 2018/12/09
Performance	
Macroscopic Features: Two colony types: small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Small gram positive coccid to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominantly in chains	Method: Gram Stain (1)
ID System: Vitek GP (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (2% Hydrogen Peroxide): negative
	
Brad Coskovic, President AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>Disclaimer: The lot number of the kit can be appearing on the packaging slip is merely a packaging identification number. The lot number displayed on this certificate is the actual lot number.</small></p> <p><small>Even for strains through the Vitek panel uses many conventional tests, the unique environment of the vial, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>1. Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and related safety information.</small></p> <p><small>Individual products are included in a recognized culture collection.</small></p>	
	<p>(1) The ATCC Licensed Distributor, the ATCC Licensed Distributor used mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is not to be used to copy these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p>(2) These kits are accredited to ISO/IEC 17025:2005</p>
 TERTIME CERT #29555-01	
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC-286	