

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**



**‘EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LA  
CORTEZA DE LA PUNICA GRANATUM (GRANADA) SOBRE LA  
PORPHYROMONA GINGIVALIS ATCC 33277 Y STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC  
25175– ESTUDIO IN VITRO. TACNA, 2022’**

*Tesis para optar por el título profesional de cirujano dentista*

**AUTOR**

Altamirano Quispe, Fiorela Elizabeth  
Código ORCID (0000-0003-1086-442X)

**ASESOR**

Mg. C.D. Esp. Portugal Motocanche, Gladys Karina  
Código ORCID (0000-0002-5803-0582)

**TACNA – PERÚ**  
**2022**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

*Por concederme el privilegio de existir en este universo y poder tener a mis padres y mi hermano a lado mío, con los que he compartido cada momento, por hacer que nunca me rinda en ésta rigurosa profesión que ahora es mi mayor pasión.*

### **A mi madre, Dora Quispe**

*Que desde pequeña me enseñaste lo que es humildad, el trabajo honesto y el sacrificio para conseguir lo que uno anhela. Por tu amor y cuidado incondicional hacia mí.*

### **A mi padre, Roger Altamirano**

*Por haberme dado su apoyo con sus mensajes de aliento y tu excelente manera de instruirme para la vida, por brindarme tu apoyo incondicional durante toda mi carrera profesional.*

### **A mi hermano, Sergio Altamirano**

*Por siempre darme opiniones honestas y confiar en mí.*

*‘A mis abuelos que ya no están conmigo, pero me ven desde el cielo y guían mi camino’.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer principalmente a Dios al haberme guiado en este largo camino de mi carrera profesional. Dándome siempre las fuerzas necesarias para no rendirme y permitirme alcanzar mis sueños.*

*A mis Padres y hermano quienes siempre han estado apoyándome y alentándome, que confiaron en mis decisiones, por su amor, apoyo incondicional, ánimo constante, sin ningún interés, en este camino de lucha y persistencia de mi formación profesional.*

*A mi asesora de tesis, Mg. Esp. Karina Portugal Motocanche, le agradezco profundamente de haberme brindado su paciencia, tiempo, guía y orientación en el desarrollo de este trabajo de investigación.*

*Al Biólogo Edwin Obando, quien me orientó para hacer realidad éste trabajo de investigación. Por brindarme sus conocimientos sobre la investigación experimental.*

*A todos los docentes involucrados durante toda mi carrera profesional, quiénes nunca desistieron en enseñar un poco más.*

*A mis amigas que hice durante toda la carrera profesional y las considero como hermanas y las aprecio y apreciaré incondicionalmente; Marjorie Ccama, Lourdes Percca, Liliana Carazas y mi prima Nohely Reyzaabal. Y para alguien especial que llegó a mi vida desde tan lejos en ese entonces y lo quise mucho mucho. My promise cumplida. (Eduardo José. Linarez P.)*

*A la doctora Leandra Ríos y a su esposo, el doctor Gregory, gracias por sus enseñanzas con tanto amor, confiar en mi persona y mi trabajo, abriéndome la oportunidad de trabajar. Los admiro un montón, son un ejemplo a seguir, como profesionales, padres y personas. A la Dra. Sughey, Dra. Neila, Dr. Diego, pronto Dr. Christian y amiga Fresia, he aprendido mucho de cada uno de ellos y les estoy profundamente agradecida.*

## DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Altamirano Quispe, Fiorela Elizabeth, en calidad de Bachiller de la Escuela Profesional de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, identificado con DNI 75513389, declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

"Efecto Antimicrobiano del Extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púñica Granatum (Granada) sobre la Porphyromona Gingivalis ATCC 33277 y Streptococcus mutans ATCC 25175 - Estudio in vitro. Tacna, 2022"

Asesorada por Mag. Esp. Gladys Karina Portugal Motocanche, la cual presente para optar el: Título Profesional de Cirujano Dentista.

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, habiéndose respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra los derechos de terceros.

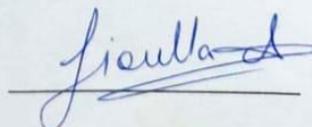
4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a La Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra.

En consecuencia, me hago responsable frente a La Universidad de cualquier responsabilidad que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello a favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.



DNI: 75513389

Fecha: 19 - 09 - 24

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| CAPÍTULO I.....   | 3  |
| EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....                            | 3  |
| 1.1. Fundamentación del problema.....                         | 3  |
| 1.2. Formulación del problema .....                           | 4  |
| 1.3. Objetivos de la investigación.....                       | 5  |
| 1.3.1. Objetivo general.....                                  | 5  |
| 1.3.2. Objetivos específicos .....                            | 5  |
| 1.4. Justificación .....                                      | 5  |
| CAPÍTULO II .....   | 8  |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....                                  | 8  |
| 2.1. Antecedentes de la investigación .....                   | 8  |
| 2.1.1. A nivel Internacional.....                             | 8  |
| 2.1.2. A nivel Nacional .....                                 | 10 |
| 2.2. Marco Teórico.....                                       | 11 |
| 2.2.1. Púnica Granatum (Granada) .....                        | 11 |
| 2.2.2. Extractos de especies vegetales .....                  | 15 |
| 2.2.3. Enfermedades más prevalentes en la cavidad bucal ..... | 15 |
| CAPITULO III .....  | 21 |
| HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES .....       | 21 |
| 3.1. Hipótesis .....  | 21 |
| 3.2. Operacionalización de variables de estudio.....          | 22 |
| CAPÍTULO IV .....   | 24 |
| METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....                          | 24 |
| 4.1. Diseño de investigación .....                            | 24 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1.1. Diseño .....  | 24 |
| 4.1.2. Tipo de investigación .....   | 24 |
| 4.2. Ámbito de estudio .....   | 25 |
| 4.3. Muestra y unidad de estudio .....   | 25 |
| 4.3.1. Unidad de estudio .....   | 25 |
| 4.3.2. Grupo control .....   | 25 |
| 4.3.3. Tamaño de muestra .....   | 25 |
| 4.3.4. Criterios de selección .....  | 27 |
| 4.4. Recolección de datos .....  | 27 |
| 4.4.1. Instrumentos de recolección de datos .....  | 27 |
| 4.4.2. Técnicas de recolección de datos .....  | 28 |
| 4.5. Equipos y materiales .....  | 28 |
| 4.5.1. Equipos .....   | 28 |
| 4.5.2. Materiales .....  | 28 |
| 4.6. Procedimientos y métodos .....  | 29 |
| 4.6.1. Coordinación .....  | 29 |
| 4.6.2. Obtención de la Púnica Granatum .....   | 30 |
| 4.6.1. Obtención del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada) .....   | 31 |
| 4.6.2. Obtención del extracto etanólico de la púnica Granatum (Granada) .....  | 35 |
| 4.6.3. Obtención de las cepas bacterianas .....  | 38 |
| 4.6.4. Preparación de los medios de cultivos .....   | 38 |
| 4.6.5. Preparación de los discos .....   | 41 |
| 4.6.6. Preparación de las placas Petri y Tips .....  | 41 |
| 4.6.7. Activación de las cepas bacterianas .....   | 41 |
| 4.6.8. Determinación de la susceptibilidad del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) mediante el método de Kirby-Bauer ..... | 43 |
| 4.6.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por método de macrodilución para el extracto acuoso y etanólico. ....            | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 4.6.10. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para el extracto acuoso y etanólico..... | 49 |
| 4.7. Cromatografía.....   | 52 |
| CAPÍTULO V.....   | 53 |
| PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS.....   | 53 |
| CAPÍTULO VI.....  | 54 |
| ASPECTOS ÉTICOS.....  | 54 |
| CAPITULO VII.....   | 55 |
| RESULTADOS.....   | 55 |
| CONTRASTE DE HIPÓTESIS.....   | 70 |
| CAPITULO VIII.....  | 82 |
| DISCUSIÓN.....  | 82 |
| CAPITULO IX.....  | 85 |
| CONCLUSIONES.....   | 85 |
| CAPÍTULO X.....   | 86 |
| RECOMENDACIONES.....  | 86 |
| CAPITULO XI.....  | 87 |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 87 |
| CAPÍTULO XII.....   | 91 |
| ANEXOS.....   | 91 |

## TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla 1. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™.....                  | 56 |
| Tabla 2. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™.....                      | 58 |
| Tabla 3. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Porphyromona gingivalis</i> ATCC® 33277™.....                | 60 |
| Tabla 4. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™.....                   | 62 |
| Tabla 5. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™..... | 64 |
| Tabla 6. Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™..... | 66 |
| Tabla 7. Efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™.....                                      | 68 |
| Tabla 8. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™.....  | 70 |
| Tabla 9. Resultados del análisis de varianza.....  | 71 |
| Tabla 10. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Porphyromona gingivalis</i> .....  | 72 |
| Tabla 11. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™.....   | 73 |
| Tabla 12. Resultados del análisis de varianza.....   | 74 |
| Tabla 13. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Streptococcus mutans</i> .....   | 75 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 14. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™..... | 76 |
| Tabla 15. Resultados del análisis de varianza .....   | 77 |
| Tabla 16. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Porphyromona gingivalis</i> .....            | 78 |
| Tabla 17. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™.....     | 79 |
| Tabla 18. Resultados del análisis de varianza .....   | 80 |
| Tabla 19. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a <i>Streptococcus mutans</i> . .....             | 81 |

## FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| Figura 1. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™. ....                 | 57  |
| Figura 2. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™. ....       | 59  |
| Figura 3. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Porphyromona gingivalis</i> ATCC® 33277™. .... | 61  |
| Figura 4. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™. ....    | 63  |
| Figura 5 y Figura 6. Selección de la fruta. ....  | 116 |
| Figura 7 y Figura 8. Descascaramiento y lavado. ....  | 116 |
| Figura 9 y Figura 10. Escurrimiento de la cáscara y esparcimiento en estufa. ....   | 116 |
| Figura 11. Deseccación de la cáscara en estufa a 50°C por 48 horas. ....  | 117 |
| Figura 12 y Figura 13. Pulverización de la cáscara con ayuda de un molinillo eléctrico. ....  | 117 |
| Figura 14 y Figura 15. Tamización del polvo de la cáscara. ....   | 117 |
| Figura 16. Obtención de polvo fino de la cáscara de la Granada. ....  | 118 |
| Figura 17 y Figura 18. Almacenamiento y conservación del polvo fino. ....   | 118 |
| Figura 19 y Figura 20. Pesaje y preparación del polvo fino con agua destilada. ....   | 118 |
| Figura 21. Conservación de la preparación para su maceración. ....  | 119 |
| Figura 22 y Figura 23. Proceso de filtración con papel Whatman. ....  | 119 |
| Figura 24, Figura 25. Obtención del extracto seco. ....   | 119 |
| Figura 26 y Figura 27. Pesaje y conservación del extracto seco. ....  | 120 |
| Figura 28 y Figura 29. Preparación de la sustancia del extracto acuoso de la Granada. ....  | 120 |
| Figura 30, Figura 31 y Figura 32. Preparación del polvo fino con alcohol 70° para su maceración en una damajuana. ....  | 120 |
| Figura 33. Proceso de filtración. ....  | 121 |
| Figura 34, Figura 35 y Figura 36. Principio activo en placa Petri llevada a estufa a una temperatura de 50°C para obtención de extracto seco. ....  | 121 |
| Figura 37 y Figura 38. Extracción del extracto seco mediante raspado y envuelto para su conservación. ....  | 121 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 39 y Figura 40. Preparación y dilución de la sustancia en vibrador eléctrico. ....  | 122 |
| Figura 41, Figura 42 y Figura 43. Activación de las cepas <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i> mediante cultivo de las bacterias en caldo BHI introducidas en Jarra de anaerobiosis con sobre Gas-Pak llevadas a la incubadora por 24 horas a 34°C. .... | 122 |
| Figura 44, Figura 45, Figura 46, Figura 47 y Figura 48. Sembrado en estría de las cepas <i>Porphyromona gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i> en viales. ....   | 122 |
| Figura 49. Viales colocados en jarra de anaerobiosis con sobre Gas-Pack. ....  | 123 |
| Figura 50. Comparación de la turbidez de la muestra con la escala de McFarland. ....   | 123 |
| Figura 51, Figura 52, Figura 53 y Figura 54. Proceso de preparación de Agar Mueller Hinton mediante dilución por calor. ....   | 123 |
| Figura 55. Agar Mueller Hinton llevada a la autoclave vertical para su esterilización. ....  | 124 |
| Figura 56, Figura 57 y Figura 58. Mueller Hinton de sólido a líquido mediante el uso de calor. ....  | 124 |
| Figura 59. Placas Petri vertidas con Mueller Hinton. ....  | 124 |
| Figura 60. Preparación de Agar Nutritivo. ....   | 124 |
| Figura 61. Agar nutritivo en viales. ....  | 125 |
| Figura 62. BHIB vertidas en tubos de ensayos. ....   | 125 |
| Figura 63. Inoculación de la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromona gingivalis</i> . .   | 125 |
| Figura 64, Figura 65 y Figura 66. Siembra de las bacterias <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromona gingivalis</i> en tubos de ensayo para su incubación. ....  | 126 |
| Figura 67. Placas Petri con Mueller Hinton gelificados por calor. ....   | 126 |
| Figura 68. Placas Petri rotuladas con nombre de bacteria y volumen. ....   | 126 |
| Figura 69 y Figura 70. Distribución del extracto en volúmenes sobre los discos de sensibilidad. ....   | 127 |
| Figura 71, Figura 72, Figura 73, Figura 74 y Figura 75. Sembrado de bacteria, distribución de discos en placas Petri, Placas Petri en jarra de anaerobiosis e incubación. ....   | 127 |
| Figura 76 y Figura 77. Medición de los halos de inhibición con una regla de vernier digital. ....  | 127 |
| Figura 78 y Figura 79. Inoculación de la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromona gingivalis</i> en viales. ....   | 128 |
| Figura 80, Figura 81 y Figura 82. Siembra de las cepas <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromona gingivalis</i> en tubos de ensayo con caldo BHIB e incubación. ....   | 128 |
| Figura 83. Discos de sensibilidad untados en extracto etanólico según volumen. ....  | 128 |
| Figura 84. Incubación de jarra de anaerobiosis con Placas Petris e incubada por 24 horas. .  | 129 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 85. Medición de los halos de inhibición del extracto etanólico frente a <i>Porphyromona gingivalis</i> .....   | 129 |
| Figura 86. Medición de los halos de inhibición del extracto etanólico frente a <i>Streptococcus mutans</i> .....  | 129 |
| Figura 87 y Figura 88. Activación de las cepas bacterianas y preparación del caldo BHIB.  | 130 |
| Figura 89 y Figura 90. Tubos de ensayo con extracto acuoso en distintos volúmenes, bacteria ( <i>Streptococcus mutans</i> / <i>Porphyromona gingivalis</i> ) y caldo BHIB.....      | 130 |
| Figura 91 y Figura 92. Tubos de ensayo con extracto etanólico en distintos volúmenes, bacteria ( <i>Streptococcus mutans</i> / <i>Porphyromona gingivalis</i> ) y caldo BHIB.....   | 130 |
| Figura 93. Tubos de ensayo después de incubación por 24 horas a 34°C. Según su turbidez se detectó los tubos que se usaran para determinación de CMB sembradas en placas Petri..... | 130 |
| Figura 94 y Figura 95. Lectura del CMB del Extracto etanólico frente a <i>Streptococcus mutans</i> .<br>.....   | 131 |
| Figura 96 y Figura 97. Lectura del CMB del extracto etanólico frente a la <i>Porphyromona gingivalis</i> .<br>.....   | 131 |
| Figura 98 y Figura 99. Lectura del CMB del Extracto acuoso frente a <i>Streptococcus mutans</i> .<br>.....  | 131 |
| Figura 100 y Figura 101. Lectura del CMB del extracto acuoso frente a la <i>Porphyromona gingivalis</i> .<br>.....  | 131 |

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™. **Material y Métodos:** El estudio realizado es de tipo experimental in vitro. Para evaluar el efecto antimicrobiano de ambos extractos se empleó el método de Kirby-Bauer. La obtención del extracto acuoso y etanólico fue mediante maceración. La población de estudio estuvo conformada por placas inoculadas con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. Se utilizó como control positivo el Gluconato de clorhexidina al 0.12% y agua destilada como control negativo. Para la lectura de los halos de inhibición se utilizó el compás de Vernier. Ambos extractos fueron sometidos a un análisis de cromatografía para la identificación de componentes. Se realizaron la técnica de macrodilución en tubos de ensayo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y en placas Petri para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB). **Resultados:** Para la prueba de normalidad se determinó con Shapiro-Wilk obteniendo el valor  $p > 0,05$  en todos los volúmenes demostrando que los datos se distribuyeron de manera normal. Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) para la demostración de medias entre grupos estudiados, también se consideró la prueba POST HOC, de Tukey, para comparaciones múltiples, donde se evidenció la existencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio. Es decir, el efecto antimicrobiano para cada grupo de estudio es diferente. Los resultados estadísticos demostraron efecto antimicrobiano en todos los volúmenes de ambos extractos sobre las dos bacterias. La CMI del extracto acuoso fue de 8,69 mg/μl, frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y 5,45 mg/μl frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. La CMI del extracto etanólico fue de 16,7 mg/μl, frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y 17,7 mg/μl frente a *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™. La CMB del extracto acuoso fue de 8,87 mg/μl, frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y 5,64 mg/μl frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. La CMB del extracto etanólico fue de 17,4 mg/μl, frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y 18,44 mg/μl frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. **Conclusiones:** La presente

investigación demostró que el extracto etanólico y acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) tiene efecto antimicrobiano sobre la *Porphyromonas Gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™. Por consiguiente, se concluyó que el extracto etanólico tiene un mayor poder antimicrobiano en comparación con el extracto acuoso sobre ambas bacterias. Estos resultados obtuvieron un nivel de confianza de 95%, el efecto antimicrobiano resultó proporcional al volumen del extracto acuoso frente a las dos bacterias.

**Palabras clave:** Agente antimicrobiano, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, Púnica Granatum, Antimicrobianos.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the antimicrobial effect of the aqueous and ethanolic extract of the bark of *Púnica Granatum* (Pomegranate) on *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ and *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

**Material and Methods:** The study carried out is experimental in vitro. To evaluate the antimicrobial effect of both extracts, the Kirby-Bauer method was used. The aqueous and ethanolic extract was obtained by maceration. The study population consisted of plates inoculated with strains of *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ and *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. Chlorhexidine gluconate at 0.12% was used as a positive control and distilled water as a negative control. The Vernier compass was used to read the inhibition zones. Both extracts were subjected to chromatography analysis for the identification of components. The macrodilution technique was carried out in test tubes for the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and in Petri dishes for the determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC).

**Results:** For the normality test, it was determined with Shapiro-Wilk, obtaining the p value > 0.05 in all volumes, demonstrating that the data were normally distributed. Analysis of variance (ANOVA) was applied to demonstrate means between studied groups. Tukey's POST HOC test was also considered for multiple comparisons, where the existence of significant differences between the study groups was evident. That is, the antimicrobial effect for each study group is different. The statistical results demonstrated antimicrobial effect in all volumes of both extracts on the two bacteria. The MIC of the aqueous extract was 8.69 mg/μl, against *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ and 5.45 mg/μl against *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. The MIC of the ethanolic extract was 16.7 mg/μl, against *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ and 17.7 mg/μl against *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. The MBC of the aqueous extract was 8.78 mg/μl, against *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ and 5.54 mg/μl against *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. The MBC of the ethanolic extract was 17.4 mg/μl, against *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ and 18.1 mg/μl against *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.

**Conclusions:** The present investigation demonstrated that the ethanolic and aqueous extract of the

bark of the Púnica Granatum (Pomegranate) has an antimicrobial effect on *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ and *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™. Therefore, it was concluded that the ethanolic extract has a greater antimicrobial power compared to the aqueous extract on both bacteria. These results obtained a confidence level of 95%, the antimicrobial effect was proportional to the volume of the aqueous extract against the two bacteria.

**Keywords:** Antimicrobial agent, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, Púnica Granatum, Antimicrobials.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos que han estado presentes en la Tierra desde el comienzo de la vida hasta el día presente; se encuentran en el agua, el aire y la tierra. En la boca habitan una gran cantidad de microorganismos, según los estudios demuestran que en un milímetro de saliva hay alrededor de 100 millones de microorganismo, pertenecientes a unas 600 especies diferentes. Las bacterias patogénicas más comunes encontradas en la cavidad bucal son *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.(1)

El *Streptococcus mutans* es una bacteria anaeróbica facultativa gram positiva que prospera en un ambiente pH ácido y se alimenta de azúcares. Es la principal causa de la formación de la caries dental, siendo el principal motivo de la destrucción y pérdida dental. (2) La caries dental, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo describe como un proceso multifactorial localizado que comienza después de la erupción de los dientes. Este proceso conduce al reblandecimiento del tejido duro del diente y puede progresar hasta la formación de una cavidad. La caries dental es una de las afecciones más comunes en el mundo, afectando entre el 95% y el 99% de la población.(3)

La *Porphyromonas gingivalis* es una bacteria anaeróbica estricta gramnegativa que se establece en el surco gingival, el espacio ubicado entre el diente y la encía; un entorno ideal para su colonización debido a la ausencia de oxígeno. La OMS reconoce a la *Porphyromonas gingivalis* como el principal agente etiológico de la enfermedad periodontal, contribuyendo al inicio y desarrollo de la periodontitis, que es una forma grave de enfermedad periodontal conllevando a la movilidad de los dientes y futura pérdida.(4)

Durante muchos siglos en diversas culturas, las plantas medicinales han sido empleadas como remedios para las dolencias de todo tipo, y en odontología no es una excepción. En la actualidad, las propiedades antimicrobianas de las plantas medicinales han generado un gran interés, especialmente en su capacidad para combatir las bacterias presentes en la cavidad bucal. Se consideran una alternativa natural, segura y económica

a los medicamentos sintéticos, que están siendo cada vez más cuestionados debido a la creciente resistencia microbiana causada por su uso excesivo. En respuesta a esta preocupación, los investigadores están dedicando más atención al estudio de las plantas y sus componentes, con el objetivo de desarrollar medicamentos alternativos que sean beneficiosos para la salud de la población.(5)

En el Perú, la rica biodiversidad de plantas, frutas y hortalizas ha llevado al uso creciente de extractos y esencias de hierbas como agentes antimicrobianos naturales para el control de enfermedades infecciosas orales.(6) Según estudios, la granada (Púnica Granatum) es una fruta que se distingue por su alto grado contenido de antioxidantes y compuestos bioactivos. Estos compuestos han demostrado poseer una variedad de propiedades beneficiosas para la salud, incluyendo actividad bactericida, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, vermífuga, estimulante, refrigerante, astringente, laxante, diurética y antihelmíntica. Por lo tanto, la fruta de granada podría ser beneficiosa en la prevención y el tratamiento de enfermedades bucales comunes como la caries dental, la gingivitis y otras afecciones orales. Este enfoque hacia el empleo de sustancias naturales para el cuidado bucal refleja tanto la tradición como el interés actual en buscar alternativas seguras y efectivas a los tratamientos convencionales.(7)

Por lo tanto, este estudio tiene como propósito evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) sobre la *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1.Fundamentación del problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca la alta prevalencia de la caries y la gingivitis, manifestándolo como las afecciones bucodentales más frecuentes que afectan de manera generalizada y significativa a nivel mundial, siendo desproporcionadamente perjudicial a personas de escasos recursos y que viven alejadas de la ciudad creando una desigualdad en el acceso de atención odontológica, dificultando la prevención y tratamiento temprano de las enfermedades bucodentales. Representando un problema de salud pública relevante que requiere de enfoque efectivos de prevención y tratamiento.(8,9)

La caries dental se distingue por la destrucción del órgano dentario y la enfermedad periodontal por el deterioro de los tejidos que sostienen al diente, ambas son causantes por colonias bacterianas presente en la placa bacteriana. (10) Según MINSA en el Perú la prevalencia de la caries es del 90.4% y de la enfermedad periodontal es del 85%, donde ambos van en aumento en jóvenes y adultos mayores. La caries y la gingivitis pueden causar dolor, incomodidad y problemas de salud bucal graves, por lo que puede impactar negativamente la calidad de vida y el bienestar de las personas de bajos recursos. Además, el costo de los tratamientos dentales puede ser prohibitivo para aquellos con recursos financieros limitados. (11)

A pesar de los avances en odontología, los tratamientos convencionales pueden presentar limitaciones, como efectos secundarios adversos o resistencia bacteriana. Esto destaca la necesidad de explorar enfoques alternativos y complementarios para el cuidado bucal. (12)

Según reportes del Ministerio de Salud (MINSA) en Perú, aproximadamente el 55% de la población opta por la automedicación en lugar de acudir a consultas médicas, lo que representa un riesgo para su salud.(13) Un ejemplo de esta práctica es el uso de clorhexidina, un antiséptico reconocido por su eficacia para disminuir y eliminar la carga

bacteriana. Sin embargo, su uso indiscriminado puede ocasionar efectos secundarios adversos, como manchas oscuras en los dientes y alteraciones en el gusto. Además, se ha observado que su uso prolongado está asociado con la formación de cálculos supra gingivales.(14)

Al proponer un plan de tratamiento con medicamentos convencionales, existe el riesgo de provocar daños secundarios en el paciente debido a un uso irracional, especialmente en aquellos que se automedican o prolongan su uso más allá de lo recomendado. Esto puede resultar en daños en las encías, el esmalte dental o incluso toxicidad por ingestión. Por lo tanto, el uso de tratamientos basados en productos naturales podría ofrecer una alternativa segura y económica para el tratamiento de enfermedades bucales comunes, especialmente para aquellos con recursos limitados o dificultades para acceder a la atención odontológica. (15)

Estudios previos han demostrado que la Púnica Granatum (Granada) contiene compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas (16) frente a cepas orales comunes tales como: *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Cándida albicans*, *Streptococcus sanguinis* (2,17,18); favorece la cicatrización frente a quemaduras y también demostraron que ayuda en la prevención y tratamiento contra el cáncer. Esto proporciona una base científica sólida para investigar su potencial uso en el cuidado bucal. (19,20) Además, existe un creciente interés en el uso de productos naturales y extractos de plantas en el cuidado de la salud, debido a su potencial para ser seguros, efectivos y accesibles. Esto motiva la investigación de la cáscara de granada como una posible alternativa natural para el tratamiento de enfermedades bucales. (7)

Por ello estos puntos proporcionan evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de Púnica Granatum (Granada) sobre la *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.

## 1.2. Formulación del problema

¿Cuál de los dos extractos de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) presenta mayor efecto antimicrobiano sobre la *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™?

### 1.3. Objetivos de la investigación

#### 1.3.1. Objetivo general

Comparar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en volúmenes de 30ul, 27.5ul, 25ul, 22.5ul, 20ul, 17.5ul sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.
- Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en volúmenes 30ul, 27.5ul, 25ul, 22.5ul, 20ul, 17.5ul sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

### 1.4. Justificación

En los últimos años, se observó un notable incremento en el uso de plantas medicinales en todo el mundo. El 80% de la población de países en vías de desarrollo recurre exclusivamente a plantas medicinales tradicionales para cubrir sus necesidades básicas de

salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el potencial de las plantas medicinales para el bienestar y la salud de la población del mundo. La OMS promueve el uso seguro y eficaz de las plantas medicinales como parte integral de los sistemas de atención médica, especialmente en regiones donde los recursos son escasos y el acceso a la atención médica convencional resulta difícil.

La investigación previa ha demostrado que la cáscara de granada contiene compuestos bioactivos con potencial actividad antimicrobiana. Estos compuestos pueden ser efectivos contra las bacterias causantes de la caries dental y la gingivitis, lo que sugiere que los extractos de cáscara de granada podrían ser una opción terapéutica prometedora para estas enfermedades bucales.

Actualmente, Perú cuenta con una rica biodiversidad de plantas y frutas con efectos terapéuticos. Es factible realizar esta investigación ya que la granada (*Púnica Granatum*) se encuentra en varias regiones del país y es reconocida por sus propiedades medicinales, además de ser de fácil acceso. En esta investigación se pretende conocer a la *Púnica Granatum* (Granada) mediante el extracto acuoso y etanólico como antimicrobiano frente a la bacteria cariogénica (*Streptococcus mutans*) y periodontal (*Porphyromonas gingivalis*) en un estudio in vitro.

Otros estudios de referencia han demostrado que la *Púnica Granatum* (Granada) contiene compuestos bioactivos como polifenoles, elagitaninos y ácidos fenólicos, que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antihelmínticas, antibacterianas, antitumorales, antivirales y astringentes. Estos hallazgos sugieren que los compuestos bioactivos de la granada podrían emplearse en la formulación y desarrollo de productos destinados al cuidado bucal y en estrategias terapéuticas en odontología, promoviendo la salud oral y ayudando a prevenir enfermedades como la caries dental y la enfermedad periodontal.

Además, la granada fomenta y promueve la investigación como una alternativa terapéutica a la clorhexidina. Esto puede ser especialmente beneficioso para zonas rurales y comunidades alejadas de centros de salud, donde el acceso a productos convencionales puede ser limitado debido a bajos niveles socioeconómicos. Utilizar la granada como recurso natural no solo ofrece una solución accesible y económica, sino que también puede

reducir los efectos secundarios asociados con el uso prolongado de clorhexidina, mejorando así la salud bucal en estas áreas desfavorecidas.

Este presente trabajo de investigación aporta la línea de investigación experimental en ‘‘Innovación tecnológica y biomateriales dentales de la Escuela Profesional de odontología de la Universidad Privada de Tacna’’ donde se evaluó el efecto antimicrobiano de los extractos sobre la *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* mediante la medición del diámetro de la inhibición del crecimiento bacteriano. Su desarrollo permitirá encontrar otra alternativa para prevenir y tratar la caries y gingivitis. Además, ayudará o complementará a futuras investigaciones, permitiendo resolver las dudas sobre el porcentaje de efecto antimicrobiano y a la vez sea utilizado como recurso natural por el paciente, como una buena alternativa para su salud bucal y general.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

##### 2.1.1. A nivel Internacional

**Gulube Z. et al. “ Effect of Punica Granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans” Sudáfrica. 2016 (2)**

Los autores tuvieron como objetivo investigar el efecto de la cáscara de la granada sobre el *Streptococcus mutans*. La metodología que usaron fue de preparar concentraciones de extractos crudos de la cáscara de la Granada, donde usaron 3 concentraciones mínimas sub-bactericidas de 1,56, 3,125 y 6,25 mg/ml.

Los datos obtenidos se analizaron utilizando las pruebas de suma de rangos de Kruskal-Wallis y Wilcoxon, revelando que las concentraciones de Púnica Granatum (granada) eliminaron exitosamente los *Streptococcus mutans* cariogénicos. Estos resultados sugieren que la Púnica Granatum (granada) podría ser efectiva en la prevención de la caries dental. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue de 6,25 mg/ml, siendo la más mínima encontrada. La Granada redujo de manera significativa la producción de ácidos con un valor ( $p < 0,01$ ). Además, la formación de biopelículas disminuyó destacadamente en un 91% después de 6 horas y en un 65% después de 24 horas. El gluconato de clorhexidina, utilizado como control positivo, eliminó las cepas de prueba.

**Procópio L. et al. “ Punica granatum L. (Pomegranate) Extract: In Vivo Study of Antimicrobial Activity against Porphyromonas gingivalis in Galleria mellonella Model” Brasil. 2016 (5)**

En este estudio los autores tuvieron como finalidad determinar la actividad antimicrobiana del extracto glicólico de granada contra el patógeno periodontal llamado *Porphyromonas gingivalis* utilizando a la *Galleria mellonella* como modelo in vivo. La metodología que aplicaron fue la utilización de quince larvas por grupo e inyectarlas en concentraciones altas de 200, 100 y 25 mg/mL de extracto glicólico de granada en la cual

mostró un efecto tóxico que los llevo a la muerte. Concluyeron que el extracto glicólico de la granada tuvo acción antimicrobiana contra la *Porphyromonas gingivalis* en concentraciones de 12,5, 6,25, 3,1 y 2,5 mg/mL

**Millo G. et al. ‘ Antibacterial Inhibitory Effects of Punica Granatum Gel on Cariogenic Bacteria: An in vitro Study’ Tailandia. 2017(21)**

El objetivo de los investigadores fue determinar si un gel elaborado a base de Púnica Granatum (Granada) tiene efecto antimicrobiano contra *Streptococcus mutans*, Streptococcus sanguinis y Lactobacillus casei. La metodología consistió en usar el extracto de la Granada disuelto en 500 mg/ml de agua. Utilizaron cromatografía para identificar y cuantificar la punicalagina y también determinaron la concentración mínima bactericida. Ensayaron el gel antimicrobiano de Púnica Granatum, un gel de clorhexidina al 2% y un gel blanco, midiendo las zonas de inhibición mediante el método de difusión en agar. Los resultados indicaron que el extracto acuoso de Púnica Granatum a 500 mg/ml inhibió completamente a *Streptococcus mutans*, Streptococcus sanguinis y Lactobacillus casei, sugiriendo su potencial para prevenir caries, aunque con una inhibición significativamente menor que la clorhexidina (control positivo). La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue de 250 mg/ml para S. *mutans*, 125 mg/ml para S. *sanguinis* y 500 mg/ml para L. *casei*. Los investigadores tenían como propósito determinar si existía un efecto antimicrobiano de un gel hecho a base de Granada contra los *Streptococcus mutans*, Streptococcus sanguinis y Lactobacillus casei.

**Ferrazzano G. et al. ‘ In Vitro Antibacterial Activity of Pomegranate Juice and Peel Extracts on Cariogenic Bacteria’ Italia. 2017 (22)**

El propósito de los investigadores fue evaluar la eficiencia del extracto hidroalcohólico de la cáscara y jugo de granada contra los microorganismos de mayor influencia, causantes del desarrollo de la caries dental. La metodología incluyó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) frente a las cepas *Streptococcus mutans* y Rothia dentocariosa. Los resultados mostraron que el extracto inhibió vigorosamente el desarrollo y la subsistencia de *Streptococcus mutans*, con una actividad inhibitoria moderada. El crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans* y del aislado clínico R. dentocariosa Rd1 se inhibió con una concentración de

extracto de jugo de granada de 25 µg/µl y 20 µg/µl, respectivamente. Los extractos de jugo de granada mostraron un MBC de 40 µg/µl contra *Streptococcus mutans* y un MBC de 140 µg/µl contra *R. dentocariosa* Rd1. Los extractos de cáscara de granada mostraron un MIC de 10 µg/µl y un MBC de 15 µg/µl frente a ambos microorganismos probados. Ambas bacterias analizadas en este estudio son sensibles a la ampicilina.

### **2.1.2. A nivel Nacional**

**Serquén L. et al. "Susceptibilidad de *Cándida albicans* a extracto etanólico de cáscara de *Púnica Granatum*". Lambayeque: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 2020 (23)**

El propósito del estudio era evaluar la sensibilidad de distintas cepas de *Cándida albicans* ante el extracto etanólico de la cáscara de granada. El procedimiento involucró el uso de cuatro cepas de *Cándida albicans* (C1, C2, C3, C4) y cinco concentraciones distintas de *Púnica Granatum* (50 mg/mL, 100 mg/mL, 150 mg/mL, 200 mg/mL, 250 mg/mL), con tres repeticiones para cada cepa. Los resultados indicaron que el extracto etanólico de la cáscara de granada fue efectivo contra todas las cepas de *Cándida albicans*. Los diámetros promedios de los halos de inhibición fueron: 23,13 mm para la cepa C1, 20,93 mm para la cepa C2, 21,6 mm para la cepa C3 y 21,0 mm para la cepa C4. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue de 1,56 mg/mL para las cepas C1 y C3, 3,125 mg/mL para la cepa C4 y 6,25 mg/mL para la cepa C2.

**Álvarez L. "Comparación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la *Psidium Guajava* (Guayaba) y *Púnica Granatum* (Granada) sobre el *Streptococcus Mutans* estudio in vitro". Huánuco: Universidad Nacional Hermilio Valdizán. 2018 (24)**

El propósito de la investigación fue evaluar en un análisis in vitro si los extractos etanólicos de guayaba y granada tienen diferentes efectos antimicrobianos sobre *Streptococcus mutans*. El procedimiento incluyó la preparación de extractos en diferentes concentraciones (100%, 75%, 50%, 25% y 12,5%). Se tomaron cinco colonias de cepas y se introdujeron en tubos de ensayo que contenían 5 mL de agua estéril. Utilizaron la técnica de difusión en agar Müller-Hinton, aplicando los extractos etanólicos

de ambos frutos en las diferentes concentraciones y luego incubaron las muestras a 37°C. El análisis de datos se realizó con el programa SPSS 23 para Windows. Al comparar los extractos etanólicos de granada y guayaba, se observó que la medida del halo promedio de inhibición fue de aproximadamente 7,675 mm para la granada y 15,4 mm para la guayaba, lo que indica una diferencia significativa en la eficacia antimicrobiana entre los extractos. Se concluyó que el extracto de guayaba fue más efectivo contra *Streptococcus mutans* que el extracto de granada.

## 2.2. Marco Teórico

### 2.2.1. Púnica Granatum (Granada)

#### 2.2.1.1. Descripción botánica

La Púnica Granatum, conocida como Pomegranate en inglés, romanzeira en portugués, An Shi Liu en China y granado en España y Latinoamérica, es una fruta jugosa. El árbol de granada crece hasta alcanzar una altura que oscila entre los 3 y los 6 metros. Se adapta a climas tropicales y templados, típicos de la región mediterránea. Sus hojas son verdes, lisas, brillantes, onduladas y alargadas. La flor tiene forma acampanada con 5 a 8 pétalos de un color anaranjado brillante. El fruto es en forma de baya globosa que puede ser amarilla, roja o verde, dependiendo de la región donde se cultive.(25)

#### 2.2.1.2. Clasificación taxonómica

|            |                 |
|------------|-----------------|
| Reino      | Plantae         |
| División   | Magnoliophyta   |
| Clase      | Magnoliopsida   |
| Orden      | Myrtales        |
| Familia    | Lythraceae      |
| Subfamilia | Punicoideae     |
| Género     | Púnica          |
| Especie    | Púnica Granatum |

Púnica Granatum (26)

### **2.2.1.3. Distribución geográfica**

La Púnica Granatum (Granada) se encuentra en varios países del mundo debido a su capacidad de adaptarse fácilmente a diferentes climas, aunque su origen se sitúa en Irán y el norte de India. Los principales exportadores y productores de granada a nivel mundial incluyen India, Israel, China, España y Egipto. En América Latina, Perú y Chile destacan por su alta producción y exportación de esta fruta.(27)

### **2.2.1.4. Composición química**

#### **2.2.1.4.1. Semilla**

La Granada contiene aceite que representa del 12 al 20% del peso total de la fruta y el 80% del peso de las semillas. Este aceite incluye triacilglicérols y en menor cantidad ligninas y ácidos hidroxicinámicos. Entre los ácidos grasos conjugados, se encuentra el ácido púnico, y entre los no conjugados están el ácido linoleico, oleico, palmítico y esteárico. Además, contiene tocoferoles (especialmente  $\gamma$ -tocoferoles), ácido ursólico, esteroides (daucosterol, campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol y colesterol), esteroides sexuales (estradiol, estrona, testosterona y estriol) y ácidos hidroxibenzoicos como el ácido gálico y el ácido elágico.(25)

#### **2.2.1.4.2. Jugo**

La Granada contiene antocianinas y flavonoides, que aumentan la intensidad del color del fruto según su maduración. También está compuesto por ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido p-cumárico), catequinas, proantocianidinas, quercetina y elagitaninos como la punicalina y la punicalagina.(25)

#### **2.2.1.4.3. Pelar**

La Granada contiene flavonoides como la kemferol y la quercetina, así como flavonas glucosiladas como la naringina. También se encuentran presentes las antocianinas (delfinidina, cianidina, pelargonidina y sus formas glicosiladas), así como los flavonoles glicosilados (rutina, kemferol-3-O-glucósido) y las flavonas (luteolina). Además, contiene ácidos hidroxibenzoicos como el ácido elágico y el ácido gálico, ácidos hidroxicinámicos como el ácido cafeico, el ácido clorogénico y el ácido p-cumárico, y catequinas y epicatequina.(25)

#### **2.2.1.4.4. Hojas**

La Granada está compuesta por taninos y algunos glucósidos como la apigenina y la naringina, que han demostrado tener efectos anticancerígenos.(25)

#### **2.2.1.4.5. Flores**

La Granada está compuesta por ácido ursólico, triterpenoides como el ácido maslínico y el ácido asiático, así como polifenoles como la punicalagina y la punicalina. La flor de la granada combate las anomalías cutáneas relacionadas con el envejecimiento y posee propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras. Además, ayuda a reducir la toxicidad cardíaca y los niveles de glucosa.(25)

#### **2.2.1.5. Efecto antimicrobiano**

Las plantas o frutos con propiedades antimicrobianas están compuestos por químicos naturales presentes en los alimentos, que pueden inhibir el

crecimiento bacteriano o causar la destrucción casi completa de los microorganismos patógenos.(28)

La actividad antibacteriana de la granada y sus componentes ha sido objeto de análisis en varios estudios, los cuales han demostrado su capacidad para inhibir significativamente diversos microorganismos.(28)

Según un estudio, se determinó que la Granada (Púnica Granatum) mostró una acción antimicrobiana efectiva contra *Porphyromonas gingivalis*.(5) Otro estudio concluyó que el extracto hidroalcohólico de la granada tuvo un efecto antimicrobiano significativo contra diversas bacterias bucales comunes, incluyendo *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* y *Enterococcus faecalis*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) y una concentración bactericida mínima (CMB) de 3.9 mg/mL para *Streptococcus mutans* (17) lo que sugiere su potencial para prevenir la caries dental. Además, otro estudio señala que concentraciones elevadas de granada pueden eliminar completamente *Streptococcus mutans*, bacteria asociada a la caries dental.(2)

#### **2.2.1.6. Efecto antiinflamatorio**

La inflamación es una respuesta fisiológica de defensa del cuerpo humano que se activa para proteger contra lesiones, venenos y otros agentes dañinos. Esta respuesta, conocida como inflamación aguda, ayuda a eliminar microbios infecciosos, eliminar irritantes y mantener las funciones normales del cuerpo. Sin embargo, la inflamación crónica a largo plazo puede provocar disfunciones en la fisiología normal del cuerpo.(29)

La Granada (Púnica Granatum), debido a su contenido de taninos, ofrece beneficios antiinflamatorios. Estudios sugieren que la granada puede ser efectiva en el tratamiento de enfermedades periodontales como la gingivitis y la periodontitis al combatir bacterias como *Porphyromonas*

*gingivalis*, *Prevotella Intermedia* y *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*.(18)

## **2.2.2. Extractos de especies vegetales**

### **2.2.2.1. Extracto acuoso**

El extracto acuoso es una preparación líquida donde el agua estéril/destilada es el solvente principal empleado. Este extracto presenta un color y aroma característicos y suaves. Se obtiene mediante un proceso que incluye secado, triturado, inmersión en agua, percolación, filtración y secado de una fruta o planta. A partir del extracto puro, se pueden elaborar diferentes concentraciones para su estudio.(30)

### **2.2.2.2. Extracto etanólico**

El extracto etanólico es una preparación líquida donde el etanol/alcohol es el solvente principal empleado. Este extracto presenta un olor característico. El extracto etanólico se produce mediante un proceso que implica el uso de materia vegetal deshidratada, que se somete a una serie de pasos, incluyendo secado, triturado, impregnación con etanol, filtración y secado. A partir de la solución, se pueden preparar diferentes concentraciones para su estudio.(31)

## **2.2.3. Enfermedades más prevalentes en la cavidad bucal**

### **2.2.3.1. Caries**

#### **2.2.3.1.1. Definición**

La OMS define la caries dental como una enfermedad multifactorial de origen localizado, caracterizada por la desmineralización del tejido duro del diente (esmalte), dando

lugar a la formación de una cavidad. , esta enfermedad se da inicio después de la erupción dentaria (32)

La caries dental es considerada multifactorial debido a la interacción de tres principales elementos en la cavidad bucal, según lo establecido por Keyes: la presencia de microorganismos como el *Streptococcus mutans*, que ejerce un papel crucial en el inicio de la caries; el huésped, representado por la saliva y el diente; y el tercer factor, la dieta o sustrato, que se refiere al consumo de carbohidratos.(33) Con el tiempo, esta conceptualización ha evolucionado, y diversos autores han añadido otros factores como el tiempo, la educación, la capacidad buffer de la saliva, su composición, el sexo y el nivel de conocimiento, entre otros.(34)

La caries dental se caracteriza por la degradación de los tejidos duros del diente, causada por la acumulación de biofilm dental en la superficie del diente, que proviene de alimentos ricos en carbohidratos y que ocasiona una desmineralización o pérdida de esmalte. Este proceso evoluciona de manera progresiva e irreversible.(35)

La caries dental es una de las afecciones más prevalentes a nivel mundial en la actualidad., afectando a personas de todas las edades, géneros y niveles socioeconómicos. Se estima que entre el 95% y el 99% de la población mundial padece de caries dental. El consumo excesivo de bebidas azucaradas y la falta de una adecuada higiene bucal se cuentan entre las principales causas de esta enfermedad. En el Perú, según datos del Ministerio de Salud (MINSA), el 90% de los escolares presenta caries dental. Las consecuencias principales de esta enfermedad tienen un impacto significativo en la calidad de vida de las personas.(34)

### 2.2.3.1.2. **Streptococcus Mutans**

Los *Streptococcus mutans* son microorganismos cariogénicos clave asociados con el desarrollo de la caries dental. Estos microorganismos producen varios ácidos, incluyendo ácido acético, láctico, propiónico y fórmico, durante el metabolismo de carbohidratos como la fructosa, sacarosa y glucosa. Estos ácidos se acumulan en la placa dental, lo que conduce a un proceso de desmineralización gradual al provocar la pérdida de minerales como el calcio y fosfato en el diente, resultando en una apariencia porosa.(36)

#### *Características*

El *Streptococcus mutans*, descubierto por Clarke en 1924, es una bacteria coco Gram positiva, no móvil, que tiende a formar cadenas. Tiene la capacidad de producir ácido láctico y puede modificar el pH de un entorno de neutro (pH 7) a ácido (pH 4.2) en aproximadamente 24 horas. Esta bacteria es neutrofílica, lo que significa que puede sobrevivir en medios con un pH neutro.(36) Además, es acidógena, ya que puede fermentar azúcares para producir ácido láctico, lo que conduce a una disminución del pH y a la desmineralización del esmalte dental. Es acidúrica, ya que puede seguir produciendo ácidos incluso en un entorno ácido. El hábitat natural del *Streptococcus mutans* es la cavidad oral humana, donde se adhiere fácilmente a la superficie del diente.(30)

## ***Taxonomía***

|          |   |
|----------|---|
| Reino    | Bacteria (Cavalier-Smith, 2002)             |
| Subreino | Posibacterias (Cavalier-Smith, 2002)        |
| Filo     | Firmicutes (corríg. Gibbons y Murray, 1978) |
| Clase    | Bacilli (Ludwig y col., 2010)               |
| Orden    | Lactobacillales (Ludwig et al., 2010)       |
| Familia  | Streptococcaceae (Deibel y Seeley, 1974)    |
| Género   | Streptococcus (Rosenbach, 1884)             |
| Especies | Streptococcus mutans (Clarke, 1924)         |

Streptococcus mutans (37)

### **2.2.3.2. Enfermedad periodontal**

#### **2.2.3.2.1. Definición**

Según los estudios muestran consistentemente que las enfermedades periodontales son una de las afecciones inflamatorias crónicas más frecuentes. Alrededor del 10% de la población mundial se estima que padece formas graves de estas enfermedades periodontales. La falta de higiene oral adecuada y el consumo de tabaco se consideran como las principales causas de esta condición.(38)

Asimismo, en Perú, según informes del MINSA, la incidencia de enfermedades periodontales oscila entre el 85% y el 87%. Hasta el momento, no se ha documentado ningún informe de periodontitis crónica en el país, y estas afecciones tienden a afectar más a personas mayores de 40 años.(39)

La enfermedad periodontal afecta los tejidos de soporte de los dientes, manifestándose a través de síntomas como hinchazón, sangrado de las encías, dolor dental, halitosis, separación de los dientes, recesión y movilidad. (9) Por lo general, estas afecciones son causadas por bacterias anaerobias Gram negativas que proliferan en el surco

gingival y generan una respuesta inflamatoria asociada a la placa bacteriana que se acumula debajo de las encías.(40)

Entre las patologías periodontales más comunes se encuentra la periodontitis crónica, la cual está asociada con la presencia de diversas bacterias, entre las que destacan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* y *Bacteroides forsythus*. Estos microorganismos desempeñan un papel crucial en la formación de bolsas periodontales, la reabsorción ósea y la destrucción de los tejidos de soporte. En particular, *Porphyromona gingivalis* es considerada la bacteria más comúnmente asociada con esta patología. (39)

#### **2.2.3.2.2. Porphyromona gingivalis**

La *Porphyromona gingivalis* es una bacteria que se encuentra con mayor prevalencia en casos de periodontitis crónica y periodontitis agresiva, siendo poco común en pacientes sanos. Estudios recientes han demostrado que la *Porphyromona gingivalis* está estrechamente asociada con la destrucción del tejido de soporte dental.(41)

##### ***Características***

La *Porphyromona gingivalis* es una bacteria anaeróbica Gram negativa, con forma de cocobacilo que mide aproximadamente entre 0.5 y 0.8 micras. Se caracteriza por poseer fimbrias, pero no flagelos, y no es esporulado. Su nutrición se basa en péptidos y aminoácidos, y requiere hemina como fuente de hierro.(4)

Según investigaciones, se ha demostrado que la *Porphyromona gingivalis* posee la habilidad de adherirse a

diversos tejidos, incluidos los tejidos periodontales. Además, puede atacar células del huésped y multiplicarse. Para lograr esto, utiliza diversos componentes bacterianos como lipopolisacáridos, fimbrias, proteasas y hemagglutininas.(42)

La *Porphyromona gingivalis* presenta numerosas vesículas en su superficie, las cuales contienen diversas enzimas que desempeñan un papel crucial en su virulencia. Estas enzimas son capaces de degradar compuestos proteicos, lo que contribuye a su capacidad para causar daño en los tejidos periodontales.(39–41).

### *Taxonomía*

|         |                          |
|---------|--------------------------|
| Dominio | Bacteria                 |
| Reino   | Monera                   |
| Filo    | Bacteroidetes            |
| Clase   | Bacteroidetes            |
| Orden   | Bacteroidales            |
| Familia | Porphyromonadaceae       |
| Género  | Porphyromonas            |
| Especie | Porphyromonas gingivalis |

Porphyromona gingivalis (39)

## CAPITULO III

### HIPÓTESIS, VARIABLES Y DEFINICIONES OPERACIONALES

#### 3.1.Hipótesis

##### Hipótesis general

H0:

El extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) no presenta efecto antimicrobiano frente a las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

H1:

El extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) si presenta efecto antimicrobiano frente a las cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

### 3.2.Operacionalización de variables de estudio

| VARIABLE INDEPENDIENTE         | DEFINICIÓN CONCEPTUAL   | DEFINICIÓN OPERACIONAL  | INDICADOR  | TIPO         | ESCALA DE MEDICION | Valor Final  |
|--------------------------------|---|---|--|--------------|--------------------|--|
| <b>AGENTES ANTIMICROBIANOS</b> | <p>Es una sustancia que se elabora a partir de la cáscara de la Púnica Granatum (Granada) por medio de procesos de desecado, pulverización, maceración en agua/ etanol, filtración y secado de dicho solvente.(43)</p> <p>La clorhexidina es una sustancia antimicrobiana considerada un Gold estándar.(44)</p> | <p>Preparado obtenido por un proceso de maceración, el que se utiliza para elaborar soluciones a diferentes volúmenes.(43)</p> <p>La clorhexidina es una sustancia antiséptica que se usó para comparar con los extractos de la Granada. (44)</p> | Extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada)    | Cuantitativa | NUMÉRICA - RAZÓN   | 30ul<br>27,5ul<br>25ul<br>22,5ul<br>20ul<br>17,5ul |
|                                |   |   |  | Cuantitativa | NUMÉRICA - RAZÓN   | 24h  |
|                                |   |   | Extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) | Cuantitativa | NUMÉRICA - RAZÓN   | 30ul<br>27,5ul<br>25ul<br>22,5ul<br>20ul<br>17,5ul |
|                                |   |   |  | Cuantitativa | NUMÉRICA - RAZÓN   | 24h  |
|                                |   |   | Gluconato de clorhexidina al 0.12%                               | Cuantitativa | NUMÉRICA - RAZÓN   | 0.12%  |
|                                |   |   |  | Cuantitativa | NUMÉRICA - RAZÓN   | 24h  |

| VARIABLE DEPENDIENTE  | DEFINICIÓN CONCEPTUAL   | DEFINICIÓN OPERACIONAL   | INDICADOR                                    | TIPO         | ESCALA DE MEDICIÓN | VALOR FINAL |
|-----------------------|---|--|--|--------------|--------------------|-------------|
| EFECTO ANTIMICROBIANO | Interacción entre los extractos de la Púnica Granatum (Granada) y las cepas bacterianas (43)                          | <p>Proceso que mide la sensibilidad de la bacteria frente a diferentes volúmenes de extractos, manifestándose como un halo alrededor del disco.(43)</p> <p><b>CMI:</b> Se define como la mínima concentración del extracto que causa una de la inhibición bacteriana.</p> <p><b>CMB:</b> Se define como la mínima concentración del extracto que mata a un 99.9% de la cepa.(45)</p> | Halo de inhibición                           | Cuantitativa | NUMERIC A-RAZÓN    | mm.         |
|                       |   |  | CMI  | Cualitativa  | NOMINAL            | mg/μL       |
|                       |   |  | CMB  | Cuantitativa | NUMERIC A-RAZÓN    | UFC mg/μL   |
| CEPAS BACTERIANA      | Población de bacterias con características genéticas y fenotípicas comunes que las distinguen de otras bacterias.(46) | Conjunto de bacterias que son usadas para la determinación de su sensibilidad frente al agente antimicrobiano.   | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ | Cualitativa  | NOMINAL            | Pg.         |
|                       |   |  | <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™     | Cualitativa  | NOMINAL            | Sm.         |

## CAPÍTULO IV

### METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.1. Diseño de investigación

##### 4.1.1. Diseño

El diseño del estudio es de tipo experimental, transversal, prospectivo, analítico e in vitro debido a que para determinar el efecto antimicrobiano se utilizaron las cáscaras de la Púnica Granatum (Granada) para la preparación del extracto acuoso y etanólico en distintos volúmenes, impregnados en discos de sensibilidad colocados en placas petris inoculadas de cepas de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™, haciendo comparación con grupo control positivo y negativo.

##### 4.1.2. Tipo de investigación

- **Experimental:** Porque para determinar el efecto antimicrobiano se manejó de manera in vitro, usándose dos extractos (Acuoso y Etanólico) de la Púnica Granatum (Granada) en distintos volúmenes sobre cepas de *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.
- **Transversal:** Debido a que la medición para los resultados se realizó en un periodo en un solo tiempo determinado.
- **Prospectivo:** Debido a que fueron datos únicos de la investigación; se llevó a cabo mediante la observación y examinación de los resultados transcurrido el tiempo estimado a medida que fue sucediendo la aparición del efecto.
- **Analítico:** Porque me permitió evaluar mi hipótesis que planteé que es buscar el efecto antimicrobiano de la Púnica Granatum (Granada).

- **In vitro:** Porque esta investigación se efectuó en un medio de cultivo controlado y se manejó todo en un laboratorio de microbiología.

## **4.2.Ámbito de estudio**

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en la ciudad de Tacna, en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, ubicada en la Avenida Miraflores S/N. El desarrollo del estudio fue supervisado por el Biólogo Microbiólogo Esp. de Laboratorio de Microbiología Edwin Denis Obando, quien estuvo a cargo del laboratorio de la Facultad de Ciencias.

Se desarrolló entre los meses de octubre 2021 a marzo del 2022.

## **4.3.Muestra y unidad de estudio**

### **4.3.1. Unidad de estudio**

Placas Petri con cepas de *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ con discos de sensibilidad impregnadas de diferentes volúmenes de extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada).

### **4.3.2. Grupo control**

Este proyecto de investigación tuvo dos grupos de control que sirvió para la comparación con los extractos.

- Grupo control positivo: Clorhexidina al 0.12%
- Grupo control negativo: Agua destilada.

### **4.3.3. Tamaño de muestra**

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó el programa de software EPIDAT versión 4.2. (Servicio de Epidemiología de la dirección Xeral de Salud Pública del

ministerio de Salud y Organización Panamericana de Salud (OPS-OMS)) Se tomó los datos obtenidos de un estudio de Millo G y cols. , dichos datos fueron de la clorhexidina al 0.12% como muestra del grupo de control positivo (21)

En el programa de EPIDAT se realizó el muestreo para el cálculo de tamaños de muestras para el contraste de hipótesis para la comparación de medias en grupos independientes.

Con varianzas iguales, una diferencia de medias a detectar de 31.180, una desviación estándar común de 2.89, razón de tamaños muestrales de 1%, intervalo de confianza de 95% y una potencia de 80%

Dando como resultado una totalidad de 4 unidades de estudio de muestra total.

**Resultados:**

| Potencia (%) | Tamaño de la muestra |             |       |
|--------------|----------------------|-------------|-------|
|              | Población 1          | Población 2 | Total |
| 80,0         | 2                    | 2           | 4     |

Para este proyecto de investigación estará representado por 2 tipos de cepas: *Porphyromona gingivalis* ATCC ® 33277 <sup>TM</sup> y *Streptococcus mutans* ATCC ® 25175 <sup>TM</sup> a 6 volúmenes (30ul; 27,5ul; 25ul; 22.5ul; 20ul; 17.5ul) del extracto etanólico y acuoso de la cáscara de Púnica Granatum, (Granada) y se considerará 8 repeticiones por volumen.

#### 4.3.4. Criterios de selección

- Criterios de Inclusión
  - Cepa de *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™ sembrado correctamente en agar.
  - Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ sembrado correctamente en agar.
  - Gluconato de Clorhexidina al 0,12% en buen estado.
  
- Criterios de Exclusión
  - Placas Petri contaminadas en el estudio de cultivo.
  - Colonias de *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ contaminadas.
  - Volúmenes de los extractos contaminados.

#### 4.4. Recolección de datos

##### 4.4.1. Instrumentos de recolección de datos

###### Ficha de recolección de datos

- La ficha es de diseño propio en el cual se registró el diámetro de los halos de cada volumen que fueron medidas por una regla vernier en milímetros. (**VER ANEXO 2 - A, B, C, D**)
- La ficha en donde se registró los valores obtenidos para realizar el procedimiento de la determinación del CMI y CMB de los extractos. (**VER ANEXO 2-E, F, G, H, I, J**)

#### 4.4.2. Técnicas de recolección de datos

##### Observación directa

- Con la ayuda de una regla vernier se midió en milímetros las zonas de inhibición mostrados en halos para la determinación del efecto antimicrobiano de la Granada (Púnica Granatum). Para la determinación del CMI se vio el primer tubo sin presencia de turbidez y para el CMB la cantidad de UFC (unidades formadoras de colonias).

#### 4.5. Equipos y materiales

##### 4.5.1. Equipos

- Autoclave
- Incubadora
- Refrigeradora
- Balanza analítica
- Cocina de resistencia por espiral/calor
- Vibrador
- Computadora

##### 4.5.2. Materiales

- Cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™
- Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™
- Púnica Granatum (Granada)
- Gluconato de Clorhexidina al 0.12%
- Papel filtro Whatman
- Discos de sensibilidad
- Agua destilada
- Ron de quemar
- Alcohol 70%
- Papel kraft
- Papel de aluminio

- BHI
- Mueller Hinton
- Agar Nutritivo
- Regla Vernier
- Hisopos estériles
- Frasco Boeco
- Gradillas
- Placas Petri
- Probeta graduada
- Damajuana
- Tubos de ensayo
- Asa digralsky
- Asa bacteriológica
- Viales
- Puntas / Tips
- Micropipeta
- Mango y hoja de bisturí
- Jarra de anaerobiosis
- Sobre Gas-Pak
- Escala McFarland
- Matraz de Erlenmeyer

## **4.6. Procedimientos y métodos**

### **4.6.1. Coordinación**

Se hizo previa coordinación con mi asesora a cargo, Mg. Esp. Karina Portugal Motocanche.

Nos contactamos con el Biólogo Microbiólogo Edwin Denis Obando Velarde, Especialista de Laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Biología Microbiología de la Facultad de Ciencia, quién estaba a cargo del área en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann y por medio de él se solicitó el permiso para el uso del laboratorio de Microbiología, con el fin de poder ejecutar el proyecto.

## **4.6.2. Obtención de la Púnica Granatum**

### **4.6.2.1. Recolección de la muestra**

Se recolectaron 10 kg de Granada (Púnica Granatum) en el mercado zonal “modelo” en la ciudad de Chiclayo del departamento de Lambayeque, Perú. En la recolección se consideró que las frutas estén maduras, sin ningún agrietamiento, infestación o pudrición en la cáscara. (VER ANEXO N°8)

### **4.6.2.2. Lavado**

La Granada (Púnica Granatum) fue llevada al laboratorio de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann en la cual se procedió a lavarlos con abundante agua potable para eliminar toda la suciedad.

Se retiró toda la cáscara separándolo del fruto, se realizó el lavado de la cáscara con abundante agua potable, eliminando todo el mesocarpio y endocarpio que se encuentra en la cara interna de la cáscara. Posteriormente se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5%, y por último se volvió a lavar con agua destilada estéril, para eliminar el cloro residual de la cáscara. (VER ANEXO N°8)

### **4.6.2.3. Secado**

Las cáscaras de la Púnica Granatum (Granada) se extendieron sobre papel absorbente y se dejaron escurrir durante 1 hora.

Después fueron colocadas sobre papel Kraft y con un dispensador de spray se comenzó a rociar hipoclorito de sodio al 0.5% para que de ese modo se pueda eliminar las bacterias, hongos o mohos que se puedan encontrar en el medio ambiente. Se realizó ese procedimiento por 2 días para mantenerlos conservados.

Pasados los 2 días, las cáscaras fueron transportadas a una bandeja metálica y fue llevado a una estufa a 50°C por 48 horas. (VER ANEXO N°8)

#### **4.6.2.4. Pulverización / Tamización**

Las cáscaras de la Púnica Granatum (Granada) fueron recolectadas en una bandeja metálica para luego ser trituradas con el uso de un molinillo eléctrico hasta obtener la sustancia en polvo y tamizarlas para separarla de las partículas que no fueron totalmente pulverizados. (VER ANEXO N°8)

#### **4.6.2.5. Almacenamiento**

El polvo de la Púnica Granatum (Granada) fue vertido en un frasco de vidrio de aproximadamente 1000 ml de capacidad y fue cubierto con papel de aluminio para su conservación y almacenamiento. (VER ANEXO N°8)

### **4.6.1. Obtención del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada)**

#### **4.6.1.1. Preparación del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada)**

Se pesaron 100 g. de muestra molida de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) y se colocaron en un frasco Boeco de vidrio de capacidad de 1000 ml y se le añadió 500 ml de agua destilada/estéril, se tuvo en cuenta que el frasco Boeco debe contener como máximo  $\frac{3}{4}$  parte del recipiente. Se comenzó a agitar para su dilución completa del polvo al líquido, revisando que no queden partículas de polvo en las paredes. Luego fue envuelto con papel de aluminio para su posterior maceración en ausencia de la luz por 2 días realizando ciertos movimientos de agitación durante 1 minuto cada 2 horas. Dejándolo en un refrigerador a una temperatura de 5°C.

Pasadas las 48 horas de maceración se hizo el filtrado con ayuda de papel de filtro Whatman de la marca ALBET en probetas y embudos de vidrio para la obtención de la sustancia estéril libre de impurezas.

Transcurridas el tiempo de filtración, se obtuvo un total de 192 ml de extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada).

El extracto acuoso obtenido de la filtración fue colocado en placas Petris y llevada a una estufa a una temperatura de 50° C para su posterior evaporación por dos días y así obtener el principio activo de la cáscara de granada.

Para el retiro del extracto seco, se realizó mediante el raspado con un mango y hoja de bisturí hasta obtener el polvillo (principio activo), la cual fue llevada a un frasco de vidrio para luego pesarla con una balanza analítica Kern ® de la cual se obtuvo 9.62 g. de polvillo (principio activo) de la Púnica Granatum (Granada). El frasco se envolvió con papel de aluminio para cubrirlo de la luz y su posterior uso.

#### **4.6.1.2. Volúmenes determinados para el extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada):**

Se trabajó a diferentes volúmenes medidas en microlitros, las cuales fueron: *30ul*; *27.5ul*; *25ul*; *20ul*; *17.5ul* (Cada una con una diferencia significativa de 2.5 ul, considerando que cada disco de sensibilidad absorbe como máximo 30ul).

#### **4.6.1.3. Determinación de las concentraciones del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada):**

Se pesó 1.4795 g. de (polvillo / principio activo) del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada) el cual se diluyó en 5ml de agua destilada. Esta solución fue preparada en un frasco ámbar.

Mediante la fórmula se determinó la densidad:

$$D = \frac{M}{V}$$

*Siendo:*

**D:** densidad (Magnitud de la cantidad de masa contenido en determinado volumen)

**M:** masa (Cantidad de materia de un cuerpo)

**V:** volumen (Magnitud del espacio ocupado por un cuerpo)

El polvillo (**1.4795 g.**) más el agua destilada (**5ml.**) obtuvo un peso de **295.9 mg**. El peso se obtuvo mediante una balanza analítica Kern.

Estos datos fueron obtenidos de la siguiente manera:

Teniendo nuestros datos:

**D:** X

$$D: \frac{1.4795 \text{ g.}}{5 \text{ ml.}} = 0.2959 \text{ g/ml.}$$

**M:** 1.4795 g.

5ml.

**V:** 5ml.

Se convirtió de gramos a miligramos mediante la regla de tres:

$$\begin{array}{r} 1 \text{ g} \dots\dots\dots 1000 \text{ mg} \\ 0.2959 \text{ g} \dots\dots\dots x \\ x = 295.9 \text{ mg} \end{array}$$

Entonces:

A partir de **295.9 mg**. Se halló las diferentes concentraciones para cada volumen:

A. Para el volumen de 30 ul.

$$\begin{array}{r} 295.9 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ x \dots\dots\dots 30 \text{ ul.} \\ x: 8.877 \text{ mg/ul.} \end{array}$$

B. Para el volumen de 27.5 ul.

$$\begin{array}{r} 295.9 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ \times \dots\dots\dots 27.5 \text{ ul.} \\ \hline \text{x: } \mathbf{8.13725 \text{ mg/ul.}} \end{array}$$

C. Para el volumen de 25 ul.

$$\begin{array}{r} 295.9 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ \times \dots\dots\dots 25 \text{ ul.} \\ \hline \text{x: } \mathbf{7.3975 \text{ mg/ul.}} \end{array}$$

D. Para el volumen de 22.5 ul.

$$\begin{array}{r} 295.9 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ \times \dots\dots\dots 22.5 \text{ ul.} \\ \hline \text{x: } \mathbf{6.65775 \text{ mg/ul.}} \end{array}$$

E. Para el volumen de 20 ul.

$$\begin{array}{r} 295.9 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ \times \dots\dots\dots 20 \text{ ul.} \\ \hline \text{x: } \mathbf{5.918 \text{ mg/ul.}} \end{array}$$

F. Para el volumen de 17.5 ul.

$$\begin{array}{r} 295.9 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ \times \dots\dots\dots 17.5 \text{ ul.} \\ \hline \text{x: } \mathbf{5.17825 \text{ mg/ul.}} \end{array}$$

## **4.6.2. Obtención del extracto etanólico de la púnica Granatum (Granada)**

### **4.6.2.1. Preparación del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada)**

Para extraer el extracto etanólico del fruto, primero se pesaron 200 g de muestra molida de la corteza y se colocaron en una damajuana de capacidad de 5L y se añadió 1000 ml. de etanol (alcohol 70°), se tuvo en consideración que la damajuana debería contener como máximo  $\frac{3}{4}$  parte del recipiente. Luego fue envuelto con papel de aluminio y se lo colocó en su canasta para su fácil transporte. Se dejó en ausencia de la luz por 93 días realizando ciertos movimientos de agitación de 3 veces al día, durante la mañana, tarde y noche para su maceración. Se aisló en un ambiente libre de humedad y sol.

Pasados los 93 días de maceración se hizo el filtrado con ayuda de papel de filtro Whatman de la marca ALBET en probetas y embudos de vidrio para la obtención de una sustancia estéril y libre de impurezas.

Transcurridos las horas de filtración se pudieron obtener 420ml. de extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada).

Este extracto etanólico obtenido de la filtración fue colocado en placas Petri y llevada a una estufa a una temperatura de 50° C para su posterior evaporación por dos días y así obtener el extracto seco de la cáscara de granada.

Para la extracción del extracto seco se realizó mediante el raspado con la ayuda de un mango y hoja de bisturí hasta obtener el polvillo (principio activo), la cual fue llevada a un frasco de vidrio para pesarse en una balanza analítica Kern®, de la cual se obtuvo 20.62 gramos de polvillo (principio activo). El frasco se envolvió con papel de aluminio para protegerlo de la luz y su posterior uso.

#### 4.6.2.2. Determinación de los volúmenes del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada):

Se trabajó a diferentes volúmenes medidas en microlitros, las cuales fueron: 30ul; 27.5ul; 25ul; 20ul; 17.5ul (Cada una con una diferencia significativa de 2.5 ul, considerando que cada disco de sensibilidad absorbe como máximo 30ul).

#### 4.6.2.3. Determinación de las concentraciones del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada):

Se utilizó **5.3665 g.** de (polvillo / principio activo) del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada) el cual se diluyó en **5ml** de agua destilada. Esta solución fue preparada en un frasco ámbar.

Mediante la fórmula se determinó la densidad:

$$D = \frac{M}{V}$$

Siendo:

**D:** densidad (Magnitud de la cantidad de masa contenido en determinado volumen)

**M:** masa (Cantidad de materia de un cuerpo)

**V:** volumen (Magnitud del espacio ocupado por un cuerpo)

El polvillo (**5.3665 g.**) más el agua destilada (**5ml**) obtuvo un peso de **1073.3 mg.** El peso se obtuvo mediante una balanza analítica Kern.

Estos datos fueron obtenidos de la siguiente manera:

Teniendo nuestros datos:

**D:** X

D:  $\frac{5.3665 \text{ g.}}{5 \text{ ml}} = 1.0733 \text{ g/ml.}$

**M:** 5.3665 g.

5ml

**V:** 5ml

Se convirtió de gramos a miligramos mediante la regla de tres:

$$\begin{array}{l}
 1\text{g} \dots\dots\dots 1000\text{mg} \\
 1.0733\text{ g} \dots\dots\dots x \\
 \mathbf{x = 1073.3\text{ mg}}
 \end{array}$$

Entonces:

A partir de **1073.3 mg**. Se hallo las diferentes concentraciones para cada volumen.

A. Para el volumen de 30 ul.

$$\begin{array}{l}
 1073.3\text{ mg} \dots\dots\dots 1000\text{ ul.} \\
 x \dots\dots\dots 30\text{ ul.} \\
 \mathbf{x: 32.199\text{ mg/ul.}}
 \end{array}$$

B. Para el volumen de 27.5 ul.

$$\begin{array}{l}
 1073.3\text{ mg} \dots\dots\dots 1000\text{ ul.} \\
 x \dots\dots\dots 27.5\text{ ul.} \\
 \mathbf{x: 29.51575\text{ mg/ul.}}
 \end{array}$$

C. Para el volumen de 25 ul.

$$\begin{array}{l}
 1073.3\text{ mg} \dots\dots\dots 1000\text{ ul.} \\
 x \dots\dots\dots 25\text{ ul.} \\
 \mathbf{x: 26.8325\text{ mg/ul.}}
 \end{array}$$

D. Para el volumen de 22.5 ul.

$$\begin{array}{l}
 1073.3\text{ mg} \dots\dots\dots 1000\text{ ul.} \\
 x \dots\dots\dots 22.5\text{ ul.} \\
 \mathbf{x: 24.14925\text{ mg/ul.}}
 \end{array}$$

E. Para el volumen de 20 ul.

$$\begin{array}{r} 1073.3 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ \times \dots\dots\dots 20 \text{ ul.} \\ \hline \mathbf{x: 21.466 \text{ mg/ul.}} \end{array}$$

F. Para el volumen de 17.5 ul.

$$\begin{array}{r} 1073.3 \text{ mg} \dots\dots\dots 1000 \text{ ul.} \\ \times \dots\dots\dots 17.5 \text{ ul.} \\ \hline \mathbf{x: 18.78275 \text{ mg/ul.}} \end{array}$$

#### 4.6.3. Obtención de las cepas bacterianas

Las cepas *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ fueron obtenidas por el laboratorio de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

#### 4.6.4. Preparación de los medios de cultivos

##### 4.6.4.1. Preparación de Mueller Hinton II Agar

Mueller Hinton II Agar es un medio de cultivo sólido que permite el desarrollo de la bacteria para hallar la prueba de susceptibilidad frente a antimicrobianos.

Para cada prueba de extracto se realizó el mismo método.

Para la preparación se tomó en cuenta las indicaciones del fabricante, siendo:

$$38\text{g} \dots\dots\dots 1000 \text{ ml}$$

Teniendo en cuenta que se usó matraz de fondo redondo de 500 ml para 28 placas Petri (15 ml.). Siendo **225** ml. que se necesitó.

Realizando la regla de tres:

$$\begin{array}{r}
 38\text{g} \dots\dots\dots 1000 \text{ ml.} \\
 x \dots\dots\dots 225 \text{ ml.} \\
 \mathbf{x = 8.55 \text{ g.}}
 \end{array}$$

Entonces; para la disolución se usó **8.55 g.** del medio y **225 ml.** de agua destilada.

Para este procedimiento se necesitó de la ayuda de una cocina de resistencia por espiral/calor para la disolución de Mueller Hinton II Agar. Se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121°C X 15 libras de presión. Se retiró el Müller Hinton en estado de gelificación y para revertirlo a estado líquido se usó la cocina de resistencia por espiral/calor.

Esta preparación se usó como medio de cultivo para las bacterias de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ en placas Petris estériles rotuladas para su gelificación.

#### 4.6.4.2. Preparación de Nutrient Agar

Nutrient Agar es un medio de cultivo sólido que permite el aislamiento de bacterias.

Para la preparación se tomó en cuenta las indicaciones del fabricante, siendo:

$$28\text{g} \dots\dots\dots 1000 \text{ ml.}$$

Teniendo en cuenta que se usó matraz Erlenmeyer de 250ml para 4 viales. Siendo **70 ml.** que se necesitó.

Realizando la regla de tres:

$$\begin{array}{r}
 28\text{g} \dots\dots\dots 1000 \text{ ml.} \\
 x \dots\dots\dots 70 \text{ ml.} \\
 \mathbf{x = 1.96 \text{ g.}}
 \end{array}$$

Entonces; para la disolución se usó **1.96 g.** del medio y **70 ml** de agua destilada.

Para dispensar el Nutrient Agar se usó papel de aluminio y para calcular el agua destilada una probeta. Se disolvió con la ayuda de una cocina de resistencia por espiral/calor y se llevó a la autoclave.

Esta preparación se usó como medio de cultivo para las bacterias de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ en viales de vidrio.

#### 4.6.4.3. Preparación de Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Brain Heart Infusion Broth es un medio de cultivo líquido que permite el desarrollo de bacterias.

Para la preparación se tomó en cuenta las indicaciones del fabricante, siendo:

37g.....1000 ml.

Teniendo en cuenta que se usó matraz Erlenmeyer de 250 ml. para la distribución en 10 tubos de ensayo (cada tubo de ensayo tiene capacidad para 10 ml.). Siendo 100 ml. que se necesitó.

Realizando la regla de tres:

37g.....1000 ml.

x.....100 ml.

$$x = 3.7 \text{ g.}$$

Entonces; para la disolución se usó **3.7 g.** del medio y **100 ml.** de agua destilada.

Se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121°C X 15 libras de presión.

Esta preparación se usó como medio de cultivo para las bacterias de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ en tubos de ensayo estériles.

#### 4.6.5. Preparación de los discos

Los discos de papel filtro (IMIPENEM) de la marca OXOID® fueron preparados. Se utilizó en total 200 discos. Siendo 48 discos para el extracto acuoso frente a *Streptococcus mutans* más 2 discos para el control, 48 discos para el extracto acuoso frente a *Porphyromonas gingivalis* más 2 discos para el control. Para el extracto etanólico se usó 48 discos frente a *Streptococcus mutans* más 2 discos para el control, 48 discos para el extracto etanólico frente a *Porphyromonas gingivalis* más 2 discos para el control. Los discos se colocaron en un vaso precipitado/Beaker con agua estéril y se esterilizaron mediante la autoclave a 121°C X 15 libras de presión por 15 minutos.

Posteriormente los discos de sensibilidad fueron distribuidos en las paredes del vaso Beaker para su posterior secado en la estufa por 30 minutos a 180°C. (VER ANEXO 8)

#### 4.6.6. Preparación de las placas Petri y Tips

Las placas Petris usadas fueron de material de vidrio, estando constituidas por una base y una tapa. Se envolvieron con papel Kraft cada placa Petri, siendo en total 56 placas.

Los Tips/Puntas para la micropipeta se prepararon de 1000 µl (azul) 200 µl (amarilla) y 10 µl (blanca) en porta Tips, posteriormente fueron envueltas en papel Kraft.

Las placas Petris y Tips fueron llevadas a la autoclave a 121°C X 15 libras de presión por 15 minutos para su esterilización.

#### 4.6.7. Activación de las cepas bacterianas

##### 4.6.7.1. Siembra en Caldo de Brain Heart Infusion Broth (BHIB) para *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™

Con ayuda de un asa bacteriológica (aro de metal Nicromo) se retiró una pequeña muestra sólida de la bacteria y se transportó a un tubo de ensayo

contenido por caldo de Brain Heart Infusion Broth (previamente rotulada) realizando la técnica por suspensión.

El tubo de ensayo sembrado fue colocado en una jarra de anaerobiosis con un sobre Gas-Pak (para que el oxígeno quede eliminado y las bacterias puedan realizar su crecimiento). La jarra se llevó a la incubadora a 24 horas a 34°C en forma anaerobia.

#### **4.6.7.2. Siembra en Nutrient Agar para *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™**

Transcurrida las 24 horas la siembra en Caldo BHI fue transportado en Nutrien Agar.

Con un asa bacteriológica se cargó una pequeña muestra líquida del tubo de ensayo y se realizó la siembra mediante la forma de estría, de abajo hacia arriba en forma de S en el vial contenido de Nutrien Agar.

El vial fue colocado en una jarra de anaerobiosis con un sobre Gas-Pak (para que el oxígeno quede eliminado y las bacterias puedan realizar su crecimiento). La jarra se llevó a la incubadora a 24 horas a 34°C en forma anaerobia

#### **4.6.7.3. Siembra en Caldo de Brain Heart Infusion Broth (BHIB) para *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™**

Transcurrida las 24 horas la siembra en Nutrien Agar fue transportado en Caldo BHI.

Con un asa bacteriológica se cargó una pequeña muestra sólida del vial y se transportó a un tubo de ensayo contenido por caldo de Brain Heart Infusion Broth (previamente rotulada) realizando la siembra mediante técnica por suspensión. El tubo, vial y asa se flameó antes y después de usar y se protegió con algodón en la entrada del envase. Previamente se dejó enfriar el asa antes de introducir al medio.

El tubo de ensayo fue colocado en una jarra de anaerobiosis con un sobre Gas-Pak (para que el oxígeno quede eliminado y las bacterias puedan realizar su crecimiento). La jarra se llevó a la incubadora a 2 horas.

Pasados las 2 horas se comparó el tubo de ensayo inoculado con la escala McFarland para visualizar la turbidez.

#### **4.6.8. Determinación de la susceptibilidad del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) mediante el método de Kirby-Bauer.**

##### **4.6.8.1. Preparación de las placas Petri con Mueller Hinton II Agar**

Se usó la cocina de resistencia por espiral/calor para convertir el Mueller Hinton II Agar de estado sólido a líquido. El Agar se dejó enfriar por unos minutos y se pasó a distribuir en cada placa Petri (siendo en total 56 placas Petri, 28 para el extracto acuoso y 28 para extracto etanólico siendo 14 placas Petri para *Streptococcus mutans* y 14 *Porphyromonas gingivalis*).

Para garantizar la esterilidad del medio se usó calor alrededor de todas las placas.

Las placas Petris previamente fueron rotuladas según los volúmenes de 30 $\mu$ L, 27.5 $\mu$ L, 25 $\mu$ L, 22.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 17.5 $\mu$ L y según la bacteria (*Streptococcus mutans* / *Porphyromonas gingivalis*).

##### **4.6.8.2. Preparación de los discos de sensibilidad**

Los discos de sensibilidad desnaturalizados (IMIPENEM) de la marca OXOID® fueron distribuidos para 8 repeticiones por volumen. Estos discos fueron impregnados de extracto acuoso según los volúmenes de 30 $\mu$ L, 27.5 $\mu$ L, 25 $\mu$ L, 22.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ L, 17.5 $\mu$ L para cada bacteria (*Streptococcus mutans* / *Porphyromonas gingivalis*). Para la distribución se usó una micropipeta de 100ul con punta amarilla de 100 ul.

#### **4.6.8.3. Inoculación de las placas Petri**

Para la inoculación se depositó 100  $\mu\text{L}$  de bacteria (*Streptococcus mutans* / *Porphyromonas gingivalis*) en cada placa Petri para cada extracto (Acuoso/Etanólico) con ayuda de una micropipeta y se dispersó con un asa digralsky de vidrio en toda la placa en movimiento circular.

#### **4.6.8.4. Distribución de los discos de sensibilidad a placas inoculadas**

Con la ayuda de una micropipeta los discos de sensibilidad fueron embebidos por el extracto (Acuoso/Etanólico) en los diferentes volúmenes (30 $\mu\text{L}$ , 27.5 $\mu\text{L}$ , 25 $\mu\text{L}$ , 22.5 $\mu\text{L}$ , 20 $\mu\text{L}$ , 17.5 $\mu\text{L}$ ) más el grupo control; luego con una pinza estéril se procedió a distribuir en las placas Petris, considerándose 4 discos para cada placa Petri. Posteriormente fueron envueltas con papel Kraft.

#### **4.6.8.5. Incubación**

Las placas Petri envueltas por papel kraft fueron depositados en jarras de anaerobiosis de forma invertida para su posterior crecimiento de la bacteria (se usaron 4 jarras de anaerobiosis por bacteria). Estuvo en la incubadora por 24 horas a 34°C en forma anaerobia.

#### **4.6.8.6. Lectura**

Después de la incubación (24 horas) se examinaron las placas para evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano indicada por una zona sin crecimiento alrededor de los discos de sensibilidad.

Con una regla de vernier (calibrador digital) se midió el diámetro del halo de inhibición (desde donde se encuentra el disco hasta donde se inhibió el crecimiento). La medida fue expresada en milímetros. La ausencia de un halo de inhibición fue interpretada como ausencia de actividad.

#### 4.6.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por método de macrodilución para el extracto acuoso y etanólico.

Para hallar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) se realizó la técnica de dilución en caldo (Mueller Hinton) mediante el método de macrodilución, usándose tubos de ensayos en un medio de cultivo líquido.

##### 4.6.9.1. Preparación de los medios para la activación de las cepas bacterianas

###### 4.6.9.1.1. Preparación de Nutrient Agar

Nutrient Agar es un medio de cultivo sólido que permite el aislamiento de bacterias.

Para la preparación se tomó en cuenta las indicaciones del fabricante, siendo:

28g.....1000 ml.

Teniendo en cuenta que se usó matraz Erlenmeyer de 250 ml. para 4 viales. Siendo **70 ml.** que se necesitó.

Realizando la regla de tres:

28g..... 1000 ml.

x..... 70 ml.

**x = 1.96 g.**

Entonces; para la disolución se usó **1.96 g.** del medio y **70 ml** de agua destilada.

Para dispensar el Nutrient Agar se usó papel de aluminio y para calcular el agua destilada una probeta. Se disolvió con la ayuda de una cocina de resistencia por espiral/calor y se llevó a la autoclave.

Esta preparación se usó como medio de cultivo para las bacterias de *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ en viales de vidrio.

#### 4.6.9.1.2. Preparación de Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Brain Heart Infusion Broth es un medio de cultivo líquido que permite el desarrollo de bacterias.

Para la preparación se tomó en cuenta las indicaciones del fabricante, siendo:

37g.....1000 ml.

Teniendo en cuenta que se usó matraz Erlenmeyer de 250ml para la distribución en 10 tubos de ensayo (cada tubo de ensayo tiene capacidad para 10ml). Siendo 100ml que se necesitó.

Realizando la regla de tres:

37g..... 1000 ml.

x..... 100 ml.

**x = 3.7 g.**

Entonces; para la disolución se usó **3.7 g.** del medio en **100 ml** de agua destilada.

Se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121°C X 15 libras de presión.

Esta preparación se usó para la distribución en tubos de ensayo estériles.

#### 4.6.9.2. Activación de las cepas

Con ayuda de un asa bacteriológica se retiró una muestra solida de la bacteria (*Streptococcus mutans* / *Porphyromonas gingivalis*) y se llevó a un tubo contenida por caldo de BHIB (Brain Heart Infusion Broth) realizando la siembra por técnica por suspensión. El tubo fue colocado en una jarra de anaerobiosis y llevado a la incubadora a 24 horas a 34°C. Transcurridas las 24 horas la siembra en Caldo BHIB fue transportado en

Nutrien Agar realizando la siembra en estrías. El vial fue colocado en la jarra de anaerobiosis y llevado a la incubadora a 24 horas a 34°C. Por último, después de las 24 horas la siembra en Nutrien Agar fue transportado en Caldo BHIB y se dejó en la incubadora por 2 horas. Pasados las 2 horas se comparó el tubo de ensayo inoculado con las bacterias con la escala McFarland para visualizar la turbidez.

#### 4.6.9.3. Preparación de caldo BHIB para la macrodilución

Para la preparación se necesitó **4.81 g.** de Brain Heart Infusion Broth.

Para el cálculo se tomó en cuenta las indicaciones del fabricante, siendo:

$$37\text{g} \dots\dots\dots 1000 \text{ ml.}$$

Teniendo en cuenta que se usó matraz Erlenmeyer de 250 ml. para la distribución en 44 tubos de ensayo (considerándose 3000 ul por tubo)

Realizando la regla de tres:

$$37\text{g} \dots\dots\dots 1000 \text{ ml.}$$

$$x \dots\dots\dots 132 \text{ ml.}$$

$$\mathbf{x = 4.8 \text{ g.}}$$

Entonces; para la disolución se usó **4.8 g.** del medio en **132 ml** de agua destilada.

El caldo BHIB se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121°C X 15 libras de presión.

#### 4.6.9.4. Preparación de los extractos

Se pesaron 2 g. de muestra (*polvillo / principio activo*) del extracto (*acuoso/etanólico*) de la Púnica Granatum (Granada) y cada muestra se diluyó en 5ml de agua destilada. Esta solución fue preparada en un frasco ámbar.

#### **4.6.9.5. Preparación de tubos de ensayo**

En total se necesitaron 44 tubos de ensayo, 22 para extracto acuoso y 22 para extracto etanólico (*ocupándose 11 tubos para Streptococcus mutans y 11 Porphyromonas gingivalis*). Considerándose que son 6 volúmenes ( $30\mu\text{L}$ ,  $27.5\mu\text{L}$ ,  $25\mu\text{L}$ ,  $22.5\mu\text{L}$ ,  $20\mu\text{L}$ ,  $17.5\mu\text{L}$ ) más los grupos controles (Positivo y Negativo). Los tubos de ensayo fueron esterilizados en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  X 15 libras de presión por 15 minutos.

#### **4.6.9.6. Siembra a través del método de macrodilución en Caldo BHIB**

Con ayuda de micropipeta graduada con Tips/puntas se vertió el Caldo BHIB (Brain Heart Infusion Broth.) en cada tubo de ensayo según la cantidad calculada en microlitros. **(VER ANEXO N°7 G, H, I, J)**

De la misma manera se procedió para la distribución de los volúmenes calculados de cada extracto (*acuoso/etanólico*) de la Púnica Granatum (Granada) en cada tubo de ensayo excepto para control positivo y negativo. **(VER ANEXO N°7 G, H, I, J)**

Para la distribución de las bacterias (*Streptococcus mutans / Porphyromona gingivalis*) cultivadas en caldo BHIB se consideró la cantidad de 300 ul para cada tubo de ensayo excepto para el control negativo. **(VER ANEXO N°7 G, H, I, J)**

Se tuvo en cuenta que cada tubo de ensayo debió contener en total 3000 ul (Extracto – BHI – Bacteria). **(VER ANEXO N°7 G, H, I, J)**

Teniendo en cuenta que en cada distribución se colocó tapones de algodón en la boca del tubo de ensayo para evitar la contaminación de la muestra.

#### **4.6.9.7. Incubación**

Los 44 tubos de ensayo fueron colocados en jarra de anaerobiosis en incubadora por 24 horas a  $34^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.6.9.8. Lectura

Al día siguiente se realizó la lectura visual, se determinó como CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) al primer tubo de aspecto cristalino (sin muestra de turbidez). (VER ANEXO N°8)

Para el extracto acuoso:

- *Porphyromona gingivalis*: Tubo N° 4
- *Streptococcus mutans*: Tubo N° 7

Para el extracto etanólico:

- *Porphyromona gingivalis*: Tubo N° 6
- *Streptococcus mutans*: Tubo N° 3

La concentración contenida de cada CMI se trasladó a tablas. (VER ANEXO N°7 K)

#### 4.6.10. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para el extracto acuoso y etanólico

Para hallar la CMB (Concentración Mínima Bactericida) se realizó tomando muestra de los tubos traslucidos y cultivándolos en placas Petri.

##### 4.6.10.1. Preparación de Mueller Hinton II Agar

Para la preparación se tuvo en cuenta del uso de 3 placas Petri para cada estudio, siendo en total el uso de 12 placas petris.

Para el cálculo se tomó en cuenta las indicaciones del fabricante, siendo:

38g.....1000 ml.

Teniendo en cuenta que se usó matraz de fondo redondo de 500 ml para 12 placas Petri (15ml). Siendo 180 ml que se necesitó.

Realizando la regla de tres:

38g..... 1000 ml.

x..... 180 ml.

$$x = 6.84 \text{ g.}$$

Entonces; para la disolución se usó **6.84 g.** del medio Mueller Hinton II Agar en **180 ml.** de agua destilada.

El Mueller Hinton II Agar fue esterilizado en autoclave por 15 minutos a 121°C X 15 libras de presión.

Para el día que se usó el Müller Hinton se revirtió de estado de gelificación a estado líquido mediante el uso de una cocina de resistencia por espiral/calor y se vertió en todas las placas Petri.

#### **4.6.10.2. Selección de tubos**

Para la selección se tomó los 3 primeros tubos de ensayo que no presentaron turbidez siendo (**VER ANEXO N°8**):

Para el extracto acuoso:

- *Porphyromona gingivalis*: Tubo N° 4,5 y 6
- *Streptococcus mutans*: Tubo N° 7,8 y 9

Para el extracto etanólico:

- *Porphyromona gingivalis*: Tubo N° 6, 7 y 8
- *Streptococcus mutans*: Tubo N° 3,4 y 5

#### **4.6.10.3. Siembra en placas Petri**

Para la siembra se usó el método por diseminación en superficie, consistiendo en colocar una pequeña muestra líquida de cada tubo de ensayo seleccionado en el centro de cada placa Petri rotulada con medio de cultivo. Con ayuda de una espátula Digrafsky se esparció por toda la placa. Cada placa fue envuelta en papel Kraft.

#### **4.6.10.4. Incubación**

Las 12 placas Petri envueltas fueron depositados en jarras de anaerobiosis de forma invertida. Estuvo en la incubadora por 24 horas a 34°C.

#### 4.6.10.5. Lectura

Al día siguiente se determinó la CMB (Concentración Mínima Bactericida) mediante el recuento de UFC (Unidad formadora de colonias), siendo: **(VER ANEXO N°8)**

Para el extracto acuoso:

- ***Porphyromona gingivalis:***
  - ✓ Placa del tubo N° 4: 3 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 5: 1 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 6: 0 UFC (CMB)
- ***Streptococcus mutans:***
  - ✓ Placa del tubo N° 7: 3 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 8: 1 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 9: 0 UFC (CMB)

Para el extracto etanólico:

- ***Porphyromona gingivalis:***
  - ✓ Placa del tubo N° 6: 7 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 7: 1 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 8: 0 UFC (CMB)
- ***Streptococcus mutans:***
  - ✓ Placa del tubo N° 3: 5 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 4: 2 UFC
  - ✓ Placa del tubo N° 5: 0 UFC (CMB)

Los resultados fueron descritos en una tabla con sus correspondientes concentraciones. **(VER ANEXO N°7 K)**

Se realizó los procedimientos siguiendo según lo relatado por el libro de Tomas Agurto Saenz; Manual de técnicas en microbiología (47) y el Manual de Pruebas de sensibilidad antimicrobiana de Stephen J.Cavarieli.(48)

#### **4.7.Cromatografía**

Para el análisis de Marcha Fito química y Perfil de compuestos Fenólicos se coordinó con el ***LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS.***

Se hizo él envío de las muestras mediante la empresa OLVA COURIER®, sede de Tacna para el correspondiente análisis de la Púnica Granatum (Granada).

Se pidió fecha de resultados, haciéndome entrega el día 05 de julio del 2022. (**VER ANEXO 5**)

## CAPÍTULO V

### PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS DE DATOS

Para realizar el procedimiento de análisis de datos en este proyecto de investigación se procedió en un primer momento mediante el uso de la estadística descriptiva o no inferencial y en segundo momento la aplicación de estadística inferencial.

#### **Primera parte – análisis descriptivo**

Los datos recolectados en fichas fueron trasladados al programa de Microsoft Office Excel 2019 en Microsoft Windows para la organización de los datos que fueron obtenidos. Posteriormente se trasladó los datos recopilados para su análisis descriptivo en el programa estadístico SPSS Statistics versión 22.0 en español, donde representamos la desviación estándar, media, mediana, mínimo y máximo del halo inhibitorio por cada grupo de estudio. Además, se realizó diagramas de cajas y bigotes.

#### **Segunda parte – análisis inferencial**

Previamente se usó la prueba de Shapiro Wilk para poder determinar el criterio de normalidad de mi hipótesis si realmente cumple con un rango ( $\geq 0.05$ ).

Para la comprobación de la hipótesis de estudio se aplicó análisis de la varianza paramétrica (ANOVA) de un factor con el propósito de comparar el halo inhibitorio de las diferentes concentraciones de la Púnica Granatum (Granada) y gluconato de clorhexidina 0.12% de en las siguientes 2 cepas: *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

Adicionalmente, consideramos una prueba POST HOC de Tukey, para comparaciones múltiple.

## CAPÍTULO VI

### ASPECTOS ÉTICOS

Antes de ejecutar se solicitó el permiso para usar la instalación de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, previamente se coordinó con mi asesora Mg. Esp. Karina Portugal Motocanche.

Una vez que el proyecto fue aprobado por los docentes del curso, fue sometido al comité de ética de la Universidad Privada de Tacna, el cual también otorgó su aprobación para la ejecución del proyecto de investigación. No hubo conflicto de intereses entre el investigador principal y la casa de estudios. **(VER ANEXO 4)**

Antes de desarrollar el proyecto se obtuvo una apropiada instrucción sobre la manipulación de las cepas biológicas y se tuvieron todos los cuidados necesarios.

## CAPITULO VII

### RESULTADOS

El análisis de Marcha Fito química y Perfil de compuestos Fenólicos del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) detectó la presencia de abundantes compuestos fenólicos, se ha evidenciado la presencia de abundantes Taninos en ambos extractos, muy poco Flavonoides en extracto acuoso y poco en extracto etanólico. Además, se ha evidenciado la presencia de 14 compuestos, se evidenció de ácido Gálico por la comparación del espectro ultravioleta de la muestra y el estándar, siendo en mayor cantidad en el extracto acuoso que etanólico; la cantidad de ácido gálico presente en la muestra se determinó mediante una curva de calibración con un estándar de ácido Gálico. La cantidad de compuestos fenólicos es la suma total de los compuestos hallados en mg/gr de extracto siendo mayor en el extracto etanólico. **(VER ANEXO 5)**.

Para la determinación del efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) sobre la *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ se realizó el método de difusión de disco Kirby-Bauer. Obtenidos los resultados fueron registrados en base de datos, creando tablas y gráficos consecuentemente realizando su interpretación.

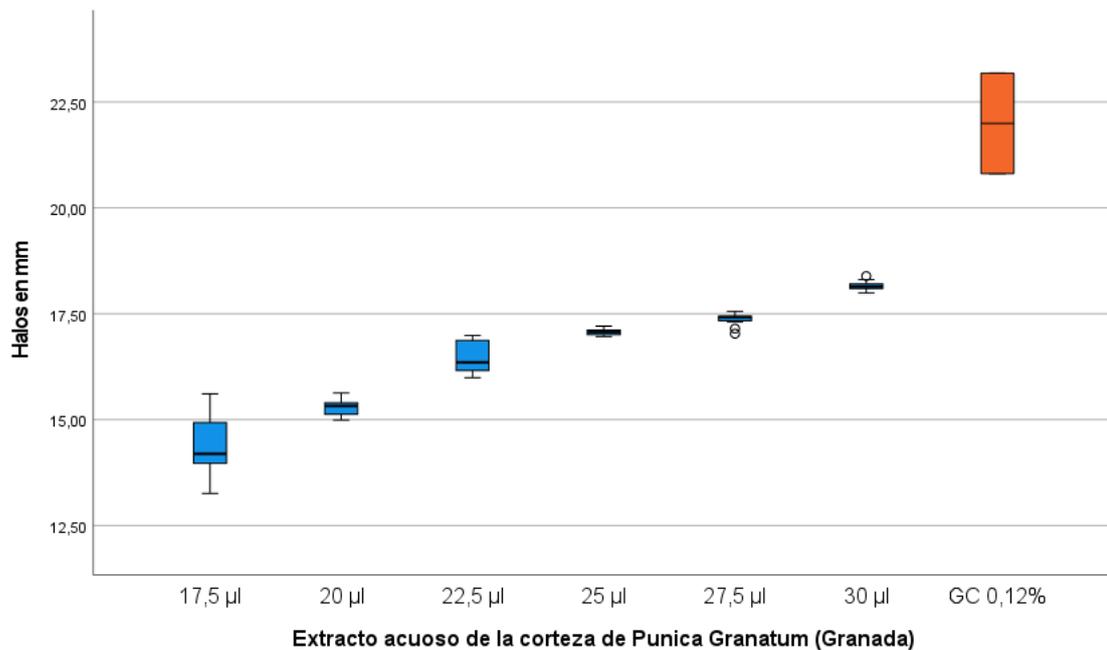
## 1. Objetivo específico 1

**Tabla 1. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.**

| Agente antimicrobiano | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ |   |       |        |        |         |                     |
|-----------------------|--|---|-------|--------|--------|---------|---------------------|
|                       | Volumen                                      | N | Rango | Mínimo | Máximo | Media   | Desviación estándar |
| Extracto acuoso       | 30 µl  | 8 | 0,40  | 17,99  | 18,39  | 18,1544 | 0,10366             |
|                       | 27,5 µl                                      | 8 | 0,53  | 17,03  | 17,56  | 17,3794 | 0,13334             |
|                       | 25 µl  | 8 | 0,25  | 16,96  | 17,21  | 17,0681 | 0,06872             |
|                       | 22,5 µl                                      | 8 | 1,00  | 15,99  | 16,99  | 16,4663 | 0,35641             |
|                       | 20 µl  | 8 | 0,64  | 14,99  | 15,63  | 15,2825 | 0,18401             |
|                       | 17,5 µl                                      | 8 | 2,35  | 13,26  | 15,61  | 14,3300 | 0,64977             |
|                       | GC 0,12%                                     | 8 | 2,37  | 20,81  | 23,18  | 21,9950 | 1,22386             |
|                       | Agua destilada                               | 8 | 0     | 0      | 0      | 0       | 0                   |

### INTERPETACIÓN:

En la Tabla 1, se observa que ha mayor volumen de extracto acuoso presenta mayor halo inhibitorio frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™, siendo una relación directamente proporcional entre estos volúmenes y el promedio de los diámetros del halo de inhibición, apreciándose que el mayor diámetro del halo de inhibición se presenta en el volumen de 30µl, con una media de 18,15 mm y el menor diámetro del halo de inhibición se encuentra en el volumen de 17,5µl, con una media de 14,33 mm. Todos los resultados están por debajo del efecto antimicrobiano del Gluconato de Clorhexidina al 0,12%, Para el control negativo se usó el agua destilada dando como resultados ningún crecimiento de halo inhibitorio.



**Figura 1. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.**

### INTERPRETACIÓN:

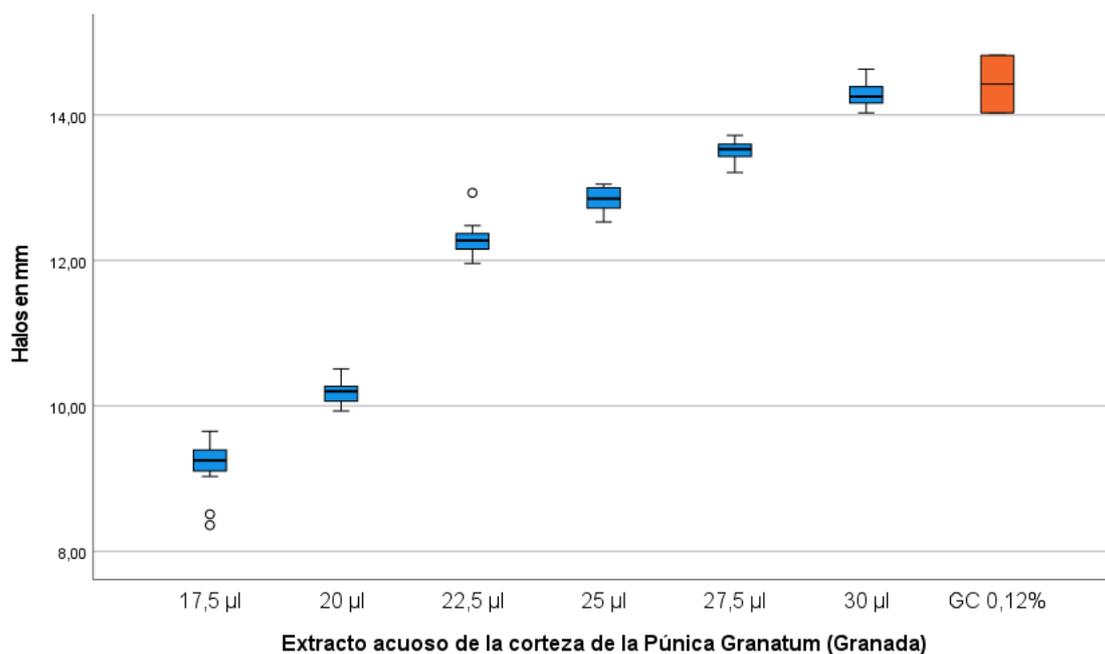
En el diagrama de cajas y bigotes, figura 1, se observa la distribución de datos intragrupo y claramente se percibe que el control positivo, Gluconato de Clorhexidina al 0.12%, es superior a los diferentes volúmenes del extracto acuoso de la Púnica Granatum, también se distingue, que la distribución de datos para los volúmenes, 17,5 µl; 20 µl; 22,5 µl; 25 µl; 27,5 µl y 30 µl, están muy próximos a sus respectivas medias, es decir, no hay variación de datos significativa intragrupo, excepcionalmente para las muestras de 17,5 µl se tiene una varianza significativa en comparación con los demás.

**Tabla 2. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

| Agente antimicrobiano | <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™ |   |       |        |        |         |                     |
|-----------------------|--|---|-------|--------|--------|---------|---------------------|
|                       | Volumen                                  | N | Rango | Mínimo | Máximo | Media   | Desviación estándar |
| Extracto acuoso       | 30 µl                                    | 8 | 0,60  | 14,03  | 14,63  | 14,2869 | 0,16676             |
|                       | 27,5 µl                                  | 8 | 0,51  | 13,21  | 13,72  | 13,5144 | 0,12827             |
|                       | 25 µl                                    | 8 | 0,52  | 12,53  | 13,05  | 12,8463 | 0,16297             |
|                       | 22,5 µl                                  | 8 | 0,97  | 11,96  | 12,93  | 12,2931 | 0,21586             |
|                       | 20 µl                                    | 8 | 0,58  | 9,93   | 10,51  | 10,1856 | 0,15586             |
|                       | 17,5 µl                                  | 8 | 1,29  | 8,36   | 9,65   | 9,2069  | 0,35190             |
|                       | GC 0,12%                                 | 8 | 0,79  | 14,03  | 14,82  | 14,4250 | 0,40795             |
|                       | Agua destilada                           | 8 | 0     | 0      | 0      | 0       | 0                   |

#### INTERPETACIÓN:

En la Tabla 2, se observa que ha mayor volumen de extracto acuoso presenta mayor halo inhibitorio frente al *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™, siendo una relación directamente proporcional entre estos volúmenes y el promedio de los diámetros del halo de inhibición, apreciándose que el mayor diámetro del halo de inhibición se presenta en el volumen de 30µl, con una media de 14,28 mm y el menor diámetro del halo de inhibición se encuentra en el volumen de 17,5µl, con una media de 9,20 mm. El Gluconato de clorhexidina al 0,12 % tiene mayor efecto antimicrobiano, 14,42 mm, en comparación a los volúmenes analizados del extracto acuoso de la Granada. Para el control negativo se usó el agua destilada dando como resultados ningún crecimiento de halo inhibitorio.



**Figura 2. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

### INTERPRETACIÓN:

En el diagrama de cajas y bigotes, figura 2, se observa notablemente que el grupo control positivo, Gluconato de Clorhexidina al 0,12%, está por encima del efecto antimicrobiano de los volúmenes 17,5µl; 20µl; 22,5µl; 25µl; 27,5µl del extracto acuoso de Granada y excepcionalmente el volumen de 30µl es comparable con el grupo control positivo; También es posible ver que la distribución de datos intragrupo para los volúmenes 17,5µl; 20µl; 22,5µl; 25µl; 27,5µl y 30µl; tienen una varianza significativamente.

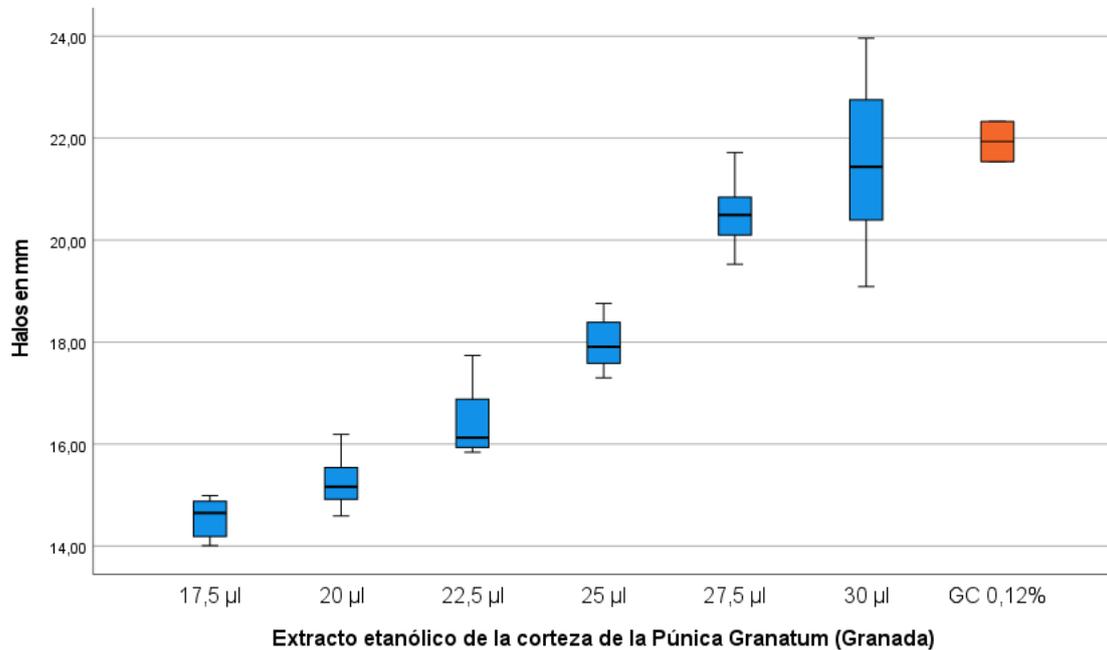
## 2. Objetivo específico 2:

**Tabla 3. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.**

| Agente antimicrobiano | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ |   |       |        |        |         |                     |
|-----------------------|--|---|-------|--------|--------|---------|---------------------|
|                       | Volumen                                      | N | Rango | Mínimo | Máximo | Media   | Desviación estándar |
| Extracto etanólico    | 30 µl  | 8 | 4,87  | 19,09  | 23,96  | 21,4725 | 1,50121             |
|                       | 27,5 µl                                      | 8 | 2,19  | 19,53  | 21,72  | 20,4706 | 0,56010             |
|                       | 25 µl  | 8 | 1,46  | 17,30  | 18,76  | 18,0025 | 0,47969             |
|                       | 22,5 µl                                      | 8 | 1,90  | 15,84  | 17,74  | 16,4563 | 0,67390             |
|                       | 20 µl  | 8 | 1,60  | 14,59  | 16,19  | 15,2663 | 0,49890             |
|                       | 17,5 µl                                      | 8 | 0,98  | 14,01  | 14,99  | 14,5613 | 0,35719             |
|                       | GC 0,12%                                     | 8 | 0,79  | 21,54  | 22,33  | 21,9350 | 0,40795             |
|                       | Agua destilada                               | 8 | 0     | 0      | 0      | 0       | 0                   |

### INTERPETACIÓN:

En la Tabla 3, se observa que ha mayor volumen de extracto etanólico presenta mayor halo inhibitorio frente a la *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™, siendo una relación directamente proporcional entre éstos volúmenes y el promedio de los diámetros del halo de inhibición, apreciándose que el mayor diámetro del halo de inhibición se presenta en el volumen de 30µl, con una media de 21,47 mm y el menor diámetro del halo de inhibición se encuentra en el volumen de 17,5µl, con una media de 14,56 mm. Si comparamos el Gluconato de clorhexidina (0,12%) con los grupos que corresponden a los volúmenes 27,5µl, 25µl, 22,5µl, 20µl, 17,5µl del extracto etanólico de Granada, vemos que el efecto antimicrobiano es mayor para el Gluconato de clorhexidina en comparación con los volúmenes estudiados, a excepción del volumen de 30µl que es comparable con el grupo del Gluconato. Para el control negativo se usó el agua destilada dando como resultados ningún crecimiento de halo inhibitorio.



**Figura 3. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.**

### **INTERPRETACIÓN:**

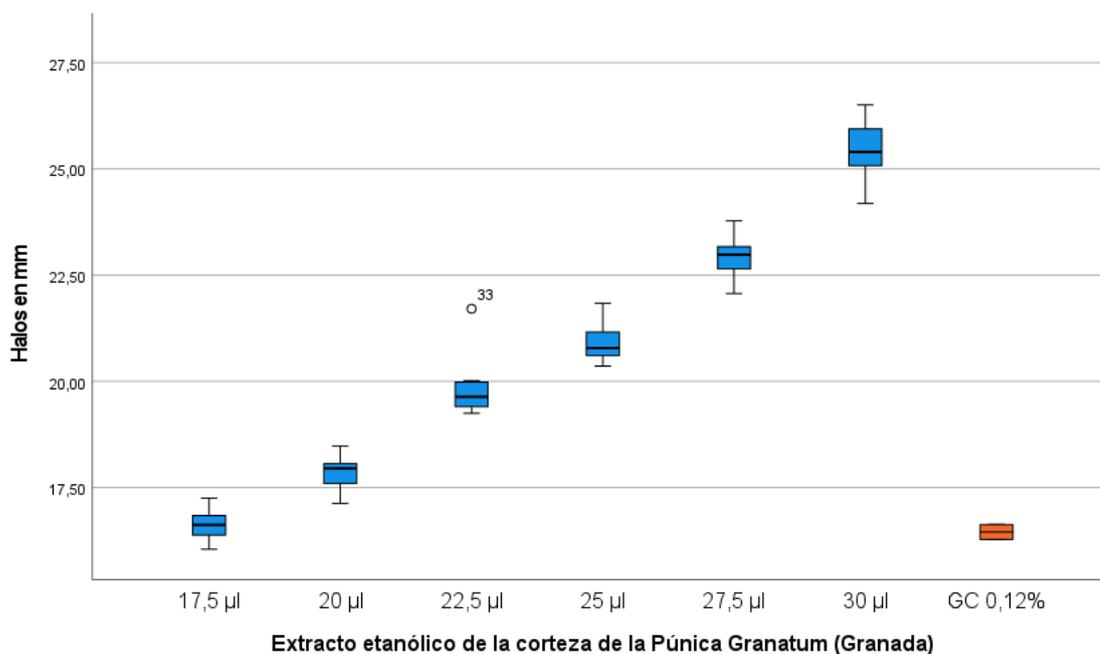
En el diagrama de cajas y bigotes, figura 3, se evidencia el crecimiento proporcional del efecto antimicrobiano con respecto a volumen, también se observa que la distribución de datos para los volúmenes 17,5µl; 20µl; 22,5µl; 25µl; 27,5µl y 30µl; intragrupo es heterogéneo, se puede apreciar una distribución de datos con mayor varianza, la cual se aprecia en cada caja con bigotes respectiva.

**Tabla 4. Resultados de los estadísticos descriptivos del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

| Agente antimicrobiano | <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™ |   |       |        |        |         |                     |
|-----------------------|--|---|-------|--------|--------|---------|---------------------|
|                       | Volumen                                  | N | Rango | Mínimo | Máximo | Media   | Desviación estándar |
| Extracto etanólico    | 30 µl                                    | 8 | 2,32  | 24,19  | 26,51  | 25,4625 | 0,60404             |
|                       | 27,5 µl                                  | 8 | 1,71  | 22,07  | 23,78  | 22,9156 | 0,43848             |
|                       | 25 µl                                    | 8 | 1,48  | 20,36  | 21,84  | 20,8881 | 0,39972             |
|                       | 22,5 µl                                  | 8 | 2,46  | 19,25  | 21,71  | 19,7700 | 0,58307             |
|                       | 20 µl                                    | 8 | 1,35  | 17,13  | 18,48  | 17,8488 | 0,37082             |
|                       | 17,5 µl                                  | 8 | 1,20  | 16,05  | 17,25  | 16,6481 | 0,33497             |
|                       | GC 0,12%                                 | 8 | 0,35  | 16,28  | 16,63  | 16,4550 | 0,18074             |
|                       | Agua destilada                           | 8 | 0     | 0      | 0      | 0       | 0                   |

#### INTERPETACIÓN:

En la Tabla 4, se observa que ha mayor volumen de extracto etanólico presenta mayor halo inhibitorio frente al *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™, siendo una relación directamente proporcional entre estos volúmenes y el promedio de los diámetros del halo de inhibición, apreciándose que el mayor diámetro del halo de inhibición se presenta en el volumen de 30µl, con una media de 25,46 mm y el menor diámetro del halo de inhibición se encuentra en el volumen de 17,5µl, con una media de 16,64 mm. Si comparamos los resultados con el Gluconato de clorhexidina al 0,12 % podemos precisar que el extracto etanólico de la corteza de Granada en sus diferentes volúmenes tiene mayor efecto antimicrobiano. Para el control negativo se usó el agua destilada dando como resultados ningún crecimiento de halo inhibitorio.



**Figura 4. Diagrama de cajas y bigotes del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en diferentes volúmenes frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

#### **INTERPRETACIÓN:**

En el diagrama de cajas y bigotes, figura 4, se observa que la distribución de datos para los volúmenes 17,5µl; 20µl; 22,5µl; 25µl; 27,5µl y 30µl; muestra una relación lineal entre el volumen y el efecto antimicrobiano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™. Además de que el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de Granada es mayor que el grupo control, Gluconato de Clorhexidina al 0,12%.

3. Objetivo específico 3:

**Tabla 5. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

| Extracto  | Bacteria  | N° Tubo | Concentración (mg/μl) | Extracto (μl) | BHI(μl) | Turbidez CMI |
|-----------|---|---------|-----------------------|---------------|---------|--------------|
| Acuoso    | <i>Porphyromonas gingivalis</i><br>ATCC® 33277™ | 4       | 5,45565625            | 19,4369818    | 2626,82 | -            |
|           | <i>Streptococcus mutans</i><br>ATCC® 25175™     | 7       | 8,6920625             | 34,7143628    | 2488,89 | -            |
| Etanólico | <i>Porphyromonas gingivalis</i><br>ATCC® 33277™ | 6       | 17,7767               | 20,27103214   | 2598,18 | -            |
|           | <i>Streptococcus mutans</i><br>ATCC® 25175™     | 3       | 16,77065              | 15,95033231   | 2653,74 | -            |

Positivo (+): Indica presencia de microorganismos (crecimiento micótico)

Negativo (-): Indica ausencia de microorganismos

### INTERPRETACIÓN:

En la tabla 5 al evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI), se puede observar que:

- A partir del tubo 4 no hay presencia de turbidez del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) por lo tanto hay la ausencia de microorganismos o ausencia del crecimiento bacteriano de la *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™, por tanto, la concentración mínima inhibitoria es 5,45565625 mg/μl.
- A partir del tubo 7 no hay presencia de turbidez del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) por lo tanto hay la ausencia de microorganismos o ausencia del crecimiento bacteriano de la *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™, por tanto, la concentración mínima inhibitoria es 8,6920625 mg/μl.
- A partir del tubo 6 no hay presencia de turbidez del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) por lo tanto hay la ausencia de microorganismos o ausencia del

crecimiento bacteriano de la *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™, por tanto, la concentración mínima inhibitoria es 17,7767 mg/μl.

- A partir del tubo 3 no hay presencia de turbidez del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) por lo tanto hay la ausencia de microorganismos o ausencia del crecimiento bacteriano de la *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™, por tanto, la concentración mínima inhibitoria es 16,77065 mg/μl.

4. Objetivo específico 4:

**Tabla 6. Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

| Extracto  | Bacteria                                     | N° Placa | Concentración (mg/μl) | UFC |
|-----------|--|----------|-----------------------|-----|
| Acuoso    | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ | 6        | 5,64059375            | 0   |
|           | <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™     | 9        | 8,877                 | 0   |
| Etanólico | <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC® 33277™ | 8        | 18,4474               | 0   |
|           | <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™     | 5        | 17,44135              | 0   |

### INTERPRETACIÓN:

En la tabla 6, después de tomar el CMI, los 3 primeros tubos que no presentaron turbidez se inocularon e incubaron en placas Petri y se obtuvieron los siguientes resultados:

- Para el extracto acuoso sobre la bacteria *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ en la placa del tubo N°6 no presentó la formación de colonia resultando con una concentración mínima bactericida (CMB) de 5,64059375 μg/ml.
- Para el extracto acuoso sobre la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ en la placa del tubo N°9 no presentó la formación de colonia resultando con una concentración mínima bactericida (CMB) de 8,877 μg/ml.
- Para el extracto etanólico sobre la bacteria *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ en la placa del tubo N°8 no presentó la formación de colonia resultando con una concentración mínima bactericida (CMB) de 18,4474 μg/ml.

- Para el extracto etanólico sobre la bacteria *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ en la placa del tubo N°5 no presentó la formación de colonia resultando con una concentración mínima bactericida (CMB) de 17,44135 µg/ml.

5. Objetivo general:

**Tabla 7. Efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) sobre *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ y *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

| Extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada)    |                                 |                            |                |                             |                            |                |
|--|---------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------------------|----------------|
| Volumen  | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |                            |                | <i>Streptococcus mutans</i> |                            |                |
|  | Media                           | Intervalo de confianza 95% |                | Media                       | Intervalo de confianza 95% |                |
|  |                                 | L. Inferior                | L. Superior    |                             | L. Inferior                | L. Superior    |
| 17,5 µl  | 14,3300                         | 13,9838                    | 14,6762        | 9,2069                      | 9,0194                     | 9,3944         |
| 20 µl  | 15,2825                         | 15,1844                    | 15,3806        | 10,1856                     | 10,1026                    | 10,2687        |
| 22,5 µl  | 16,4663                         | 16,2763                    | 16,6562        | 12,2931                     | 12,1781                    | 12,4081        |
| 25 µl  | 17,0681                         | 17,0315                    | 17,1047        | 12,8463                     | 12,7594                    | 12,9331        |
| 27,5 µl  | 17,3794                         | 17,3083                    | 17,4504        | 13,5144                     | 13,4460                    | 13,5827        |
| 30 µl  | 18,1544                         | 18,0991                    | 18,2096        | 14,2869                     | 14,1980                    | 14,3757        |
| <b>GC 0,12%</b>                                    | <b>21,9950</b>                  | <b>21,3428</b>             | <b>22,6472</b> | <b>14,4250</b>              | <b>14,2076</b>             | <b>14,6424</b> |
| Agua destilada                                     | 0                               | 0                          | 0              | 0                           | 0                          | 0              |
| Extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada) |                                 |                            |                |                             |                            |                |
| Volumen  | <i>Porphyromonas gingivalis</i> |                            |                | <i>Streptococcus mutans</i> |                            |                |
|  | Media                           | Intervalo de confianza 95% |                | Media                       | Intervalo de confianza 95% |                |
|  |                                 | L. Inferior                | L. Superior    |                             | L. Inferior                | L. Superior    |
| 17,5 µl  | 14,5613                         | 14,3709                    | 14,7516        | 16,6481                     | 16,4696                    | 16,8266        |
| 20 µl  | 15,2663                         | 15,0004                    | 15,5321        | 17,8488                     | 17,6512                    | 18,0463        |
| 22,5 µl  | 16,4563                         | 16,0972                    | 16,8153        | 19,7700                     | 19,4593                    | 20,0807        |
| 25 µl  | 18,0025                         | 17,7469                    | 18,2581        | 20,8881                     | 20,6751                    | 21,1011        |
| 27,5 µl  | 20,4706                         | 20,1722                    | 20,7691        | 22,9156                     | 22,6820                    | 23,1493        |
| 30 µl  | 21,4725                         | 20,6726                    | 22,2724        | 25,4625                     | 25,1406                    | 25,7844        |
| <b>GC 0,12%</b>                                    | <b>21,9350</b>                  | <b>21,7176</b>             | <b>22,1524</b> | <b>16,4550</b>              | <b>16,3587</b>             | <b>16,5513</b> |
| Agua destilada                                     | 0                               | 0                          | 0              | 0                           | 0                          | 0              |

**INTERPRETACIÓN:**

En la tabla 7, se observa que, el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) es mayor frente *Porphyromonas gingivalis* que, frente a *Streptococcus mutans* para los volúmenes analizados. Resultados contrarios se obtienen para el extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada), donde el efecto antimicrobiano es mayor frente *Streptococcus mutans* que, frente a *Porphyromonas gingivalis* para todos los volúmenes analizados. También, se puede observar que el extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) tiene mayor efecto antimicrobiano frente

*Streptococcus mutans* que, el extracto acuoso de la misma bacteria, con un valor medio mínimo de 16,6481 mm de diámetro de halo de inhibición para el volumen de 17,5 $\mu$ l y un valor medio máximo de 25,4625 mm para el volumen de 30 $\mu$ l. Con respecto al efecto antimicrobiano frente a *Porphyromonas gingivalis* aplicando los dos extractos, acuoso y etanólico, se observa resultados aproximados en los volúmenes respectivos.

## CONTRASTE DE HIPÓTESIS

Para comprobar la hipótesis, se realizó previamente la prueba de normalidad; como  $n < 50$ , se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

**Tabla 8. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.**

| Volumen | Kolmogórov-Smirnov <sup>a</sup> |     |        | Shapiro-Wilk |     |       |
|---------|---------------------------------|-----|--------|--------------|-----|-------|
|         | Estadístico                     | gl. | Sig.   | Estadístico  | gl. | Sig.  |
| 17,5 µl | 0,216                           | 8   | 0,044  | 0,906        | 8   | 0,100 |
| 20 µl   | 0,170                           | 8   | 0,200* | 0,903        | 8   | 0,089 |
| 22,5 µl | 0,154                           | 8   | 0,200* | 0,946        | 8   | 0,428 |
| 25 µl   | 0,103                           | 8   | 0,200* | 0,961        | 8   | 0,684 |
| 27,5 µl | 0,136                           | 8   | 0,200* | 0,932        | 8   | 0,263 |
| 30 µl   | 0,152                           | 8   | 0,200* | 0,956        | 8   | 0,586 |

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

H<sub>0</sub>: Los datos se distribuyen de manera normal.

H<sub>1</sub>: Los datos se distribuyen de manera No normal.

## INTERPRETACIÓN

La tabla 8, muestra la significancia para cada variable (volumen), los cuales son mayores a 0,05; a excepción del volumen 17,5 µl; por lo que aceptamos la hipótesis nula (H<sub>0</sub>), los datos se distribuyen de manera normal. De acuerdo con lo aceptado, se debe utilizar una prueba paramétrica. Posteriormente, se selecciona la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA).

Para evidenciar la diferencia de medias entre los grupos estudiados, se realizó la prueba ANOVA. (Tabla 9).

**Tabla 9. Resultados del análisis de varianza**

|                         | <b>Suma de cuadrados</b> | <b>Gl</b> | <b>Media cuadrática</b> | <b>F</b> | <b>Sig.</b> |
|-------------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|----------|-------------|
| <b>Entre grupos</b>     | 582,299                  | 6         | 97,050                  | 321,330  | <0,001      |
| <b>Dentro de grupos</b> | 31,713                   | 105       | 0,302                   |          |             |
| <b>Total</b>            | 614,011                  | 111       |                         |          |             |

**Ho:** El extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) no presenta efecto antimicrobiano frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.

**Ha:** El extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) presenta efecto antimicrobiano frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.

La tabla 9, se puede ver que, la significancia es menor a 0,05 por lo tanto, aceptamos la hipótesis alterna, El extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) presenta efecto antimicrobiano frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. También, se desarrolló una prueba POST HOC, de Tukey, para comparaciones múltiples. (Tabla 10)

**Tabla 10. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis*.**

| (I) Antimicrobiano |          | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig.  | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|--------------------|----------|----------------------------|----------------|-------|-------------------------------|-----------------|
|                    |          |                            |                |       | Límite inferior               | Límite superior |
| <b>17,5 µl</b>     | 20 µl    | -,95250*                   | 0,19430        | 0,001 | -1,5366                       | -0,3684         |
|                    | 22,5 µl  | -2,13625*                  | 0,19430        | 0,001 | -2,7204                       | -1,5521         |
|                    | 25 µl    | -2,73812*                  | 0,19430        | 0,001 | -3,3223                       | -2,1540         |
|                    | 27,5 µl  | -3,04937*                  | 0,19430        | 0,001 | -3,6335                       | -2,4652         |
|                    | 30 µl    | -3,82437*                  | 0,19430        | 0,001 | -4,4085                       | -3,2402         |
|                    | GC 0,12% | -7,66500*                  | 0,19430        | 0,001 | -8,2491                       | -7,0809         |
| <b>20 µl</b>       | 17,5 µl  | ,95250*                    | 0,19430        | 0,001 | 0,3684                        | 1,5366          |
|                    | 22,5 µl  | -1,18375*                  | 0,19430        | 0,001 | -1,7679                       | -0,5996         |
|                    | 25 µl    | -1,78563*                  | 0,19430        | 0,001 | -2,3698                       | -1,2015         |
|                    | 27,5 µl  | -2,09688*                  | 0,19430        | 0,001 | -2,6810                       | -1,5127         |
|                    | 30 µl    | -2,87187*                  | 0,19430        | 0,001 | -3,4560                       | -2,2877         |
|                    | GC 0,12% | -6,71250*                  | 0,19430        | 0,001 | -7,2966                       | -6,1284         |
| <b>22,5 µl</b>     | 17,5 µl  | 2,13625*                   | 0,19430        | 0,001 | 1,5521                        | 2,7204          |
|                    | 20 µl    | 1,18375*                   | 0,19430        | 0,001 | 0,5996                        | 1,7679          |
|                    | 25 µl    | -,60187*                   | 0,19430        | 0,039 | -1,1860                       | -0,0177         |
|                    | 27,5 µl  | -,91312*                   | 0,19430        | 0,001 | -1,4973                       | -0,3290         |
|                    | 30 µl    | -1,68812*                  | 0,19430        | 0,001 | -2,2723                       | -1,1040         |
|                    | GC 0,12% | -5,52875*                  | 0,19430        | 0,001 | -6,1129                       | -4,9446         |
| <b>25 µl</b>       | 17,5 µl  | 2,73813*                   | 0,19430        | 0,001 | 2,1540                        | 3,3223          |
|                    | 20 µl    | 1,78563*                   | 0,19430        | 0,001 | 1,2015                        | 2,3698          |
|                    | 22,5 µl  | ,60187*                    | 0,19430        | 0,039 | 0,0177                        | 1,1860          |
|                    | 27,5 µl  | -0,31125                   | 0,19430        | 0,681 | -0,8954                       | 0,2729          |
|                    | 30 µl    | -1,08625*                  | 0,19430        | 0,001 | -1,6704                       | -0,5021         |
|                    | GC 0,12% | -4,92687*                  | 0,19430        | 0,001 | -5,5110                       | -4,3427         |
| <b>27,5 µl</b>     | 17,5 µl  | 3,04937*                   | 0,19430        | 0,001 | 2,4652                        | 3,6335          |
|                    | 20 µl    | 2,09688*                   | 0,19430        | 0,001 | 1,5127                        | 2,6810          |
|                    | 22,5 µl  | ,91312*                    | 0,19430        | 0,001 | 0,3290                        | 1,4973          |
|                    | 25 µl    | 0,31125                    | 0,19430        | 0,681 | -0,2729                       | 0,8954          |
|                    | 30 µl    | -,77500*                   | 0,19430        | 0,002 | -1,3591                       | -0,1909         |
|                    | GC 0,12% | -4,61563*                  | 0,19430        | 0,001 | -5,1998                       | -4,0315         |
| <b>30 µl</b>       | 17,5 µl  | 3,82437*                   | 0,19430        | 0,001 | 3,2402                        | 4,4085          |
|                    | 20 µl    | 2,87187*                   | 0,19430        | 0,001 | 2,2877                        | 3,4560          |
|                    | 22,5 µl  | 1,68812*                   | 0,19430        | 0,001 | 1,1040                        | 2,2723          |
|                    | 25 µl    | 1,08625*                   | 0,19430        | 0,001 | 0,5021                        | 1,6704          |
|                    | 27,5 µl  | ,77500*                    | 0,19430        | 0,002 | 0,1909                        | 1,3591          |
|                    | GC 0,12% | -3,84063*                  | 0,19430        | 0,001 | -4,4248                       | -3,2565         |

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

También, consideramos una prueba POST HOC, de Tukey, poniendo en evidencia, la existencia de diferencias significativas entre los grupos, es decir, el efecto antimicrobiano para cada grupo de estudio es diferente debido a que los  $p$  - valores son menores a 0,05.

**Tabla 11. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

| Volumen        | Kolmogórov-Smirnov <sup>a</sup> |     |        | Shapiro-Wilk |     |       |
|----------------|---------------------------------|-----|--------|--------------|-----|-------|
|                | Estadístico                     | gl. | Sig.   | Estadístico  | gl. | Sig.  |
| <b>17,5 µl</b> | 0,183                           | 8   | 0,159  | 0,874        | 8   | 0,031 |
| <b>20 µl</b>   | 0,122                           | 8   | 0,200* | 0,971        | 8   | 0,858 |
| <b>22,5 µl</b> | 0,156                           | 8   | 0,200* | 0,872        | 8   | 0,029 |
| <b>25 µl</b>   | 0,134                           | 8   | 0,200* | 0,933        | 8   | 0,272 |
| <b>27,5 µl</b> | 0,143                           | 8   | 0,200* | 0,966        | 8   | 0,765 |
| <b>30 µl</b>   | 0,133                           | 8   | 0,200* | 0,967        | 8   | 0,790 |

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

H<sub>0</sub>: Los datos se distribuyen de manera normal.

H<sub>1</sub>: Los datos se distribuyen de manera No normal

La tabla 11, muestra los valores *p* o significancia, los cuales son mayores a 0,05 en todos los volúmenes; por lo que aceptamos H<sub>0</sub>, los datos se distribuyen de manera normal. De acuerdo con lo aceptado, se debe utilizar una prueba paramétrica. Posteriormente, se selecciona la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA).

Para evidenciar la diferencia de medias entre los grupos estudiados, se realizó la prueba ANOVA. (Tabla 12).

**Tabla 12. Resultados del análisis de varianza**

|                         | Suma de cuadrados | Gl  | Media cuadrática | F        | Sig.   |
|-------------------------|-------------------|-----|------------------|----------|--------|
| <b>Entre grupos</b>     | 387,401           | 6   | 64,567           | 1046,288 | <0,001 |
| <b>Dentro de grupos</b> | 6,480             | 105 | 0,062            |          |        |
| <b>Total</b>            | 393,881           | 111 |                  |          |        |

**Ho:** El extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) no presenta efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

**Ha:** El extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) presenta efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

La tabla 12, se puede ver que el  $p$  - valor o significancia es menor a 0,05 por lo tanto, rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis del investigador, El extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada) presenta efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

También, consideramos una prueba POST HOC, de Tukey, para comparaciones múltiples, donde se evidencio la existencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio. Es decir, el efecto antimicrobiano para cada grupo de estudio es diferente. (Tabla 13).

**Tabla 13. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Streptococcus mutans*.**

| (I) Antimicrobiano | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig.    | Intervalo de confianza al 95% |                 |         |
|--------------------|----------------------------|----------------|---------|-------------------------------|-----------------|---------|
|                    |                            |                |         | Límite inferior               | Límite superior |         |
| <b>17,5 µl</b>     | 20 µl                      | -,97875*       | 0,08783 | 0,001                         | -1,2428         | -0,7147 |
|                    | 22,5 µl                    | -3,08625*      | 0,08783 | 0,001                         | -3,3503         | -2,8222 |
|                    | 25 µl                      | -3,63937*      | 0,08783 | 0,001                         | -3,9034         | -3,3753 |
|                    | 27,5 µl                    | -4,30750*      | 0,08783 | 0,001                         | -4,5715         | -4,0435 |
|                    | 30 µl                      | -5,08000*      | 0,08783 | 0,001                         | -5,3440         | -4,8160 |
|                    | GC 0,12%                   | -5,21812*      | 0,08783 | 0,001                         | -5,4822         | -4,9541 |
| <b>20 µl</b>       | 17,5 µl                    | ,97875*        | 0,08783 | 0,001                         | 0,7147          | 1,2428  |
|                    | 22,5 µl                    | -2,10750*      | 0,08783 | 0,001                         | -2,3715         | -1,8435 |
|                    | 25 µl                      | -2,66063*      | 0,08783 | 0,001                         | -2,9247         | -2,3966 |
|                    | 27,5 µl                    | -3,32875*      | 0,08783 | 0,001                         | -3,5928         | -3,0647 |
|                    | 30 µl                      | -4,10125*      | 0,08783 | 0,001                         | -4,3653         | -3,8372 |
|                    | GC 0,12%                   | -4,23937*      | 0,08783 | 0,001                         | -4,5034         | -3,9753 |
| <b>22,5 µl</b>     | 17,5 µl                    | 3,08625*       | 0,08783 | 0,001                         | 2,8222          | 3,3503  |
|                    | 20 µl                      | 2,10750*       | 0,08783 | 0,001                         | 1,8435          | 2,3715  |
|                    | 25 µl                      | -,55313*       | 0,08783 | 0,001                         | -0,8172         | -0,2891 |
|                    | 27,5 µl                    | -1,22125*      | 0,08783 | 0,001                         | -1,4853         | -0,9572 |
|                    | 30 µl                      | -1,99375*      | 0,08783 | 0,001                         | -2,2578         | -1,7297 |
|                    | GC 0,12%                   | -2,13188*      | 0,08783 | 0,001                         | -2,3959         | -1,8678 |
| <b>25 µl</b>       | 17,5 µl                    | 3,63937*       | 0,08783 | 0,001                         | 3,3753          | 3,9034  |
|                    | 20 µl                      | 2,66063*       | 0,08783 | 0,001                         | 2,3966          | 2,9247  |
|                    | 22,5 µl                    | ,55313*        | 0,08783 | 0,001                         | 0,2891          | 0,8172  |
|                    | 27,5 µl                    | -,66813*       | 0,08783 | 0,001                         | -0,9322         | -0,4041 |
|                    | 30 µl                      | -1,44062*      | 0,08783 | 0,001                         | -1,7047         | -1,1766 |
|                    | GC 0,12%                   | -1,57875*      | 0,08783 | 0,001                         | -1,8428         | -1,3147 |
| <b>27,5 µl</b>     | 17,5 µl                    | 4,30750*       | 0,08783 | 0,001                         | 4,0435          | 4,5715  |
|                    | 20 µl                      | 3,32875*       | 0,08783 | 0,001                         | 3,0647          | 3,5928  |
|                    | 22,5 µl                    | 1,22125*       | 0,08783 | 0,001                         | 0,9572          | 1,4853  |
|                    | 25 µl                      | ,66813*        | 0,08783 | 0,001                         | 0,4041          | 0,9322  |
|                    | 30 µl                      | -,77250*       | 0,08783 | 0,001                         | -1,0365         | -0,5085 |
|                    | GC 0,12%                   | -,91062*       | 0,08783 | 0,001                         | -1,1747         | -0,6466 |
| <b>30 µl</b>       | 17,5 µl                    | 5,08000*       | 0,08783 | 0,001                         | 4,8160          | 5,3440  |
|                    | 20 µl                      | 4,10125*       | 0,08783 | 0,001                         | 3,8372          | 4,3653  |
|                    | 22,5 µl                    | 1,99375*       | 0,08783 | 0,001                         | 1,7297          | 2,2578  |
|                    | 25 µl                      | 1,44062*       | 0,08783 | 0,001                         | 1,1766          | 1,7047  |
|                    | 27,5 µl                    | ,77250*        | 0,08783 | 0,001                         | 0,5085          | 1,0365  |
|                    | GC 0,12%                   | -0,13813       | 0,08783 | 0,700                         | -0,4022         | 0,1259  |

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

Se realizó la prueba POST HOC de Tukey, se evidenció la existencia de diferencias significativas entre los grupos. Esto indica que el efecto antimicrobiano varía significativamente entre los diferentes volúmenes del extracto acuoso de la Púnica Granatum, ya que los valores de p son menores a 0.05.

**Tabla 14. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.**

| Volumen | Kolmogórov-Smirnov <sup>a</sup> |    |        | Shapiro-Wilk |    |       |
|---------|---------------------------------|----|--------|--------------|----|-------|
|         | Estadístico                     | gl | Sig.   | Estadístico  | gl | Sig.  |
| 17,5 µl | 0,181                           | 8  | 0,167  | 0,878        | 8  | 0,036 |
| 20 µl   | 0,186                           | 8  | 0,143  | 0,900        | 8  | 0,081 |
| 22,5 µl | 0,222                           | 8  | 0,034  | 0,815        | 8  | 0,004 |
| 25 µl   | 0,141                           | 8  | 0,200* | 0,940        | 8  | 0,345 |
| 27,5 µl | 0,091                           | 8  | 0,200* | 0,981        | 8  | 0,968 |
| 30 µl   | 0,148                           | 8  | 0,200* | 0,959        | 8  | 0,644 |

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

H<sub>0</sub>: Los datos se distribuyen de manera normal.

H<sub>1</sub>: Los datos se distribuyen de manera No normal.

La tabla 14, se nos puede advertir que la significancia para los diferentes volúmenes, son:  $p > 0,05$ ; por lo que aceptamos H<sub>0</sub>, los datos se distribuyen de manera normal, a excepción de las muestras cuyo volumen es 22,5 µl. Habiéndose realizado la prueba de normalidad, se aplicó la prueba de ANOVA para demostrar la diferencia de medias entre los grupos estudiados. (Tabla 15).

**Tabla 15. Resultados del análisis de varianza**

|                         | Suma de cuadrados | de gl | Media cuadrática | F       | Sig.   |
|-------------------------|-------------------|-------|------------------|---------|--------|
| <b>Entre grupos</b>     | 874,541           | 6     | 145,757          | 268,889 | <0,001 |
| <b>Dentro de grupos</b> | 56,917            | 105   | 0,542            |         |        |
| <b>Total</b>            | 931,458           | 111   |                  |         |        |

**Ho:** El extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granda) no presenta efecto antimicrobiano frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.

**Ha:** El extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granda) presenta efecto antimicrobiano frente a a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™.

La tabla 15 se observa que, el  $p$  – valor es menor a 0,05 por lo tanto, aceptamos la hipótesis alterna, El extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum presenta efecto antimicrobiano frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™. También, consideramos una prueba POST HOC, de Tukey, para comparaciones múltiples, entre los grupos de estudio, evidenciando la existencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio. Es decir, el efecto antimicrobiano es diferente para cada grupo de estudio. (Tabla 16).

**Tabla 16. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis*.**

| (I) Antimicrobiano |              | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig.    | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|--------------------|--------------|----------------------------|----------------|---------|-------------------------------|-----------------|
|                    |              |                            |                |         | Límite inferior               | Límite superior |
| <b>17,5 µl</b>     | 20 µl        | -0,70500                   | 0,26031        | 0,106   | -1,4876                       | 0,0776          |
|                    | 22,5 µl      | -1,89500*                  | 0,26031        | 0,001   | -2,6776                       | -1,1124         |
|                    | 25 µl        | -3,44125*                  | 0,26031        | 0,001   | -4,2238                       | -2,6587         |
|                    | 27,5 µl      | -5,90937*                  | 0,26031        | 0,001   | -6,6919                       | -5,1268         |
|                    | 30 µl        | -6,91125*                  | 0,26031        | 0,001   | -7,6938                       | -6,1287         |
|                    | GC 0,12%     | -7,37375*                  | 0,26031        | 0,001   | -8,1563                       | -6,5912         |
|                    | <b>20 µl</b> | 17,5 µl                    | 0,70500        | 0,26031 | 0,106                         | -0,0776         |
| 22,5 µl            |              | -1,19000*                  | 0,26031        | 0,001   | -1,9726                       | -0,4074         |
| 25 µl              |              | -2,73625*                  | 0,26031        | 0,001   | -3,5188                       | -1,9537         |
| 27,5 µl            |              | -5,20437*                  | 0,26031        | 0,001   | -5,9869                       | -4,4218         |
| 30 µl              |              | -6,20625*                  | 0,26031        | 0,001   | -6,9888                       | -5,4237         |
| GC 0,12%           |              | -6,66875*                  | 0,26031        | 0,001   | -7,4513                       | -5,8862         |
| <b>22,5 µl</b>     |              | 17,5 µl                    | 1,89500*       | 0,26031 | 0,001                         | 1,1124          |
|                    | 20 µl        | 1,19000*                   | 0,26031        | 0,001   | 0,4074                        | 1,9726          |
|                    | 25 µl        | -1,54625*                  | 0,26031        | 0,001   | -2,3288                       | -0,7637         |
|                    | 27,5 µl      | -4,01437*                  | 0,26031        | 0,001   | -4,7969                       | -3,2318         |
|                    | 30 µl        | -5,01625*                  | 0,26031        | 0,001   | -5,7988                       | -4,2337         |
|                    | GC 0,12%     | -5,47875*                  | 0,26031        | 0,001   | -6,2613                       | -4,6962         |
|                    | <b>25 µl</b> | 17,5 µl                    | 3,44125*       | 0,26031 | 0,001                         | 2,6587          |
| 20 µl              |              | 2,73625*                   | 0,26031        | 0,001   | 1,9537                        | 3,5188          |
| 22,5 µl            |              | 1,54625*                   | 0,26031        | 0,001   | 0,7637                        | 2,3288          |
| 27,5 µl            |              | -2,46813*                  | 0,26031        | 0,001   | -3,2507                       | -1,6856         |
| 30 µl              |              | -3,47000*                  | 0,26031        | 0,001   | -4,2526                       | -2,6874         |
| GC 0,12%           |              | -3,93250*                  | 0,26031        | 0,001   | -4,7151                       | -3,1499         |
| <b>27,5 µl</b>     |              | 17,5 µl                    | 5,90937*       | 0,26031 | 0,001                         | 5,1268          |
|                    | 20 µl        | 5,20437*                   | 0,26031        | 0,001   | 4,4218                        | 5,9869          |
|                    | 22,5 µl      | 4,01437*                   | 0,26031        | 0,001   | 3,2318                        | 4,7969          |
|                    | 25 µl        | 2,46813*                   | 0,26031        | 0,001   | 1,6856                        | 3,2507          |
|                    | 30 µl        | -1,00188*                  | 0,26031        | 0,004   | -1,7844                       | -0,2193         |
|                    | GC 0,12%     | -1,46438*                  | 0,26031        | 0,001   | -2,2469                       | -0,6818         |
|                    | <b>30 µl</b> | 17,5 µl                    | 6,91125*       | 0,26031 | 0,001                         | 6,1287          |
| 20 µl              |              | 6,20625*                   | 0,26031        | 0,001   | 5,4237                        | 6,9888          |
| 22,5 µl            |              | 5,01625*                   | 0,26031        | 0,001   | 4,2337                        | 5,7988          |
| 25 µl              |              | 3,47000*                   | 0,26031        | 0,001   | 2,6874                        | 4,2526          |
| 27,5 µl            |              | 1,00188*                   | 0,26031        | 0,004   | 0,2193                        | 1,7844          |
| GC 0,12%           |              | -0,46250                   | 0,26031        | 0,567   | -1,2451                       | 0,3201          |

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

Además, se llevó a cabo una prueba POST HOC de Tukey que reveló diferencias significativas entre los grupos. Esto demuestra que el efecto antimicrobiano varía de manera significativa entre los distintos volúmenes del extracto acuoso de la Púnica Granatum, ya que los valores de p son menores a 0.05.

**Tabla 17. Pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk para muestras del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.**

| Volumen        | Kolmogórov-Smirnov |    |        | Shapiro-Wilk |    |       |
|----------------|--------------------|----|--------|--------------|----|-------|
|                | Estadístico        | gl | Sig.   | Estadístico  | gl | Sig.  |
| <b>17,5 µl</b> | 0,183              | 8  | 0,159  | 0,874        | 8  | 0,031 |
| <b>20 µl</b>   | 0,122              | 8  | 0,200* | 0,971        | 8  | 0,858 |
| <b>22,5 µl</b> | 0,156              | 8  | 0,200* | 0,872        | 8  | 0,029 |
| <b>25 µl</b>   | 0,134              | 8  | 0,200* | 0,933        | 8  | 0,272 |
| <b>27,5 µl</b> | 0,143              | 8  | 0,200* | 0,966        | 8  | 0,765 |
| <b>30 µl</b>   | 0,133              | 8  | 0,200* | 0,967        | 8  | 0,790 |

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

H<sub>0</sub>: Los datos se distribuyen de manera normal.

H<sub>1</sub>: Los datos se distribuyen de manera No normal

La tabla 17 muestra que, los *p* valores, son mayores a 0,05; por lo que aceptamos H<sub>0</sub>, los datos se distribuyen de manera normal. De acuerdo con lo aceptado, se debe utilizar una prueba paramétrica. Posteriormente, se selecciona la prueba paramétrica de análisis de varianza (ANOVA).

Para evidenciar la diferencia de medias entre los grupos estudiados, se realizó la prueba ANOVA. (Tabla 18).

**Tabla 18. Resultados del análisis de varianza**

|                         | Suma de cuadrados | de gl | Media cuadrática | F       | Sig.   |
|-------------------------|-------------------|-------|------------------|---------|--------|
| <b>Entre grupos</b>     | 1081,782          | 6     | 180,297          | 942,377 | <0,001 |
| <b>Dentro de grupos</b> | 20,089            | 105   | 0,191            |         |        |
| <b>Total</b>            | 1101,871          | 111   |                  |         |        |

**Ho:** El extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) no presenta efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

**Ha:** El extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) presenta efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™.

La tabla 18, se puede ver que la significancia es menor a 0,05 por lo tanto, rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis del investigador, El extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) presenta efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™. También, consideramos una prueba POST HOC, de Tukey, poniendo en evidencia, la existencia de diferencias significativas entre los grupos, es decir, el efecto antimicrobiano para cada grupo de estudio es diferente. (Tabla 19).

**Tabla 19. Pruebas post hoc (Tukey) para comparaciones múltiples del extracto etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) frente a *Streptococcus mutans*.**

| (I) Antimicrobiano |              | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig.    | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|--------------------|--------------|----------------------------|----------------|---------|-------------------------------|-----------------|
|                    |              |                            |                |         | Límite inferior               | Límite superior |
| <b>17,5 µl</b>     | 20 µl        | -1,20062*                  | 0,15465        | 0,001   | -1,6655                       | -0,7357         |
|                    | 22,5 µl      | -3,12187*                  | 0,15465        | 0,001   | -3,5868                       | -2,6570         |
|                    | 25 µl        | -4,24000*                  | 0,15465        | 0,001   | -4,7049                       | -3,7751         |
|                    | 27,5 µl      | -6,26750*                  | 0,15465        | 0,001   | -6,7324                       | -5,8026         |
|                    | 30 µl        | -8,81437*                  | 0,15465        | 0,001   | -9,2793                       | -8,3495         |
|                    | GC 0,12%     | 0,19313                    | 0,15465        | 0,873   | -0,2718                       | 0,6580          |
|                    | <b>20 µl</b> | 17,5 µl                    | 1,20062*       | 0,15465 | 0,001                         | 0,7357          |
| 22,5 µl            |              | -1,92125*                  | 0,15465        | 0,001   | -2,3862                       | -1,4563         |
| 25 µl              |              | -3,03937*                  | 0,15465        | 0,001   | -3,5043                       | -2,5745         |
| 27,5 µl            |              | -5,06687*                  | 0,15465        | 0,001   | -5,5318                       | -4,6020         |
| 30 µl              |              | -7,61375*                  | 0,15465        | 0,001   | -8,0787                       | -7,1488         |
| GC 0,12%           |              | 1,39375*                   | 0,15465        | 0,001   | 0,9288                        | 1,8587          |
| <b>22,5 µl</b>     |              | 17,5 µl                    | 3,12187*       | 0,15465 | 0,001                         | 2,6570          |
|                    | 20 µl        | 1,92125*                   | 0,15465        | 0,001   | 1,4563                        | 2,3862          |
|                    | 25 µl        | -1,11812*                  | 0,15465        | 0,001   | -1,5830                       | -0,6532         |
|                    | 27,5 µl      | -3,14562*                  | 0,15465        | 0,001   | -3,6105                       | -2,6807         |
|                    | 30 µl        | -5,69250*                  | 0,15465        | 0,001   | -6,1574                       | -5,2276         |
|                    | GC 0,12%     | 3,31500*                   | 0,15465        | 0,001   | 2,8501                        | 3,7799          |
|                    | <b>25 µl</b> | 17,5 µl                    | 4,24000*       | 0,15465 | 0,001                         | 3,7751          |
| 20 µl              |              | 3,03938*                   | 0,15465        | 0,001   | 2,5745                        | 3,5043          |
| 22,5 µl            |              | 1,11812*                   | 0,15465        | 0,001   | 0,6532                        | 1,5830          |
| 27,5 µl            |              | -2,02750*                  | 0,15465        | 0,001   | -2,4924                       | -1,5626         |
| 30 µl              |              | -4,57437*                  | 0,15465        | 0,001   | -5,0393                       | -4,1095         |
| GC 0,12%           |              | 4,43313*                   | 0,15465        | 0,001   | 3,9682                        | 4,8980          |
| <b>27,5 µl</b>     |              | 17,5 µl                    | 6,26750*       | 0,15465 | 0,001                         | 5,8026          |
|                    | 20 µl        | 5,06687*                   | 0,15465        | 0,001   | 4,6020                        | 5,5318          |
|                    | 22,5 µl      | 3,14562*                   | 0,15465        | 0,001   | 2,6807                        | 3,6105          |
|                    | 25 µl        | 2,02750*                   | 0,15465        | 0,001   | 1,5626                        | 2,4924          |
|                    | 30 µl        | -2,54687*                  | 0,15465        | 0,001   | -3,0118                       | -2,0820         |
|                    | GC 0,12%     | 6,46063*                   | 0,15465        | 0,001   | 5,9957                        | 6,9255          |
|                    | <b>30 µl</b> | 17,5 µl                    | 8,81437*       | 0,15465 | 0,001                         | 8,3495          |
| 20 µl              |              | 7,61375*                   | 0,15465        | 0,001   | 7,1488                        | 8,0787          |
| 22,5 µl            |              | 5,69250*                   | 0,15465        | 0,001   | 5,2276                        | 6,1574          |
| 25 µl              |              | 4,57438*                   | 0,15465        | 0,001   | 4,1095                        | 5,0393          |
| 27,5 µl            |              | 2,54688*                   | 0,15465        | 0,001   | 2,0820                        | 3,0118          |
| GC 0,12%           |              | 9,00750*                   | 0,15465        | 0,001   | 8,5426                        | 9,4724          |

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

Además, se realizó una prueba POST HOC de Tukey que reveló diferencias significativas entre los grupos. Esto demuestra que el efecto antimicrobiano varía de manera significativa entre los distintos volúmenes del extracto acuoso de la Púnica Granatum, dado que los valores de p son menores a 0.05.

## CAPITULO VIII

### DISCUSIÓN

Gracias a la biodiversidad natural de nuestro país contamos con plantas de beneficios terapéuticos. La utilización de plantas ha demostrado tener efectos analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, etc. incluso mucho antes de ser estudiadas y analizadas de manera científica. Se ha demostrado que la granada tiene propiedades beneficiosas para la salud bucal por sus componentes como el tanino, ácido gálico y compuestos fenólicos. La *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*, son una de las principales causantes de la gingivitis y caries. Estas enfermedades bucales se encuentran con mayor incidencia en personas que viven alejadas y tienen difícil el acceso a un centro de salud o tienen limitaciones económicas.

Por ello se llevó a cabo esta investigación donde se propuso comprobar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) sobre la *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*. Habiendo realizado esta investigación, en los resultados demostraron la eficacia de ambos extractos como antimicrobiano sobre las dos bacterias, hallándose una diferencia significativa entre el efecto del extracto acuoso y el extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada).

Según el estudio por **Gulube Z, et al**, (2) sus resultados coinciden con lo encontrado en mi estudio, quien también realizó el estudio de la cáscara de la Púnica Granatum (Granada) en extracto crudo, donde concluyeron que el efecto a altas concentraciones tiene el potencial de combatir contra la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*, siendo su concentración sub-bactericidas oscilante entre 12,5 y 25 mg/ml comparándolo con mi estudio se pudo observar que a concentraciones oscilantes entre 8,877 y 32,199 mg/μl tubo poder antimicrobiano, estando casi cerca en los resultados. La concentración mínima inhibitoria más baja fue de 6,25 mg/ml en comparación de mi trabajo el más bajo fue de 8,69 mg/ μl, siendo mi resultado mayor que de Gulube.

Según el estudio por **Millo G, et al**, (21). Han demostrado su efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la Púnica Granatum frente al *Streptococcus mutans*, aclarando que ellos utilizaron la presentación en gel, esto nos hace suponer un mayor contacto para la

efectividad antimicrobiana comparada solo con el extracto acuoso de nuestro estudio. En sus resultados demostraron que a una concentración de 500 mg/ml de extracto acuoso mostró inhibición completa del *Streptococcus mutans* en comparación con nuestro trabajo se demostró que a una concentración de 5,17825 mg/  $\mu$ l manifestó un efecto inhibitorio del extracto acuoso. Su CMI fue de 250 mg/ml en relación con el CMI obtenido de nuestro trabajo fue de 8,69 mg/  $\mu$ l.

Según el estudio por **Ferrazzano G, et al**, (22). Nos demuestra una vez más la efectividad de la Púnica Granatum. En su investigación realizaron el estudio con la cáscara y el jugo de granada, el extracto hidroalcohólico de la cáscara de la granada demostró una moderada actividad inhibitoria frente al *Streptococcus mutans*, se encontró un CMI de 10  $\mu$ g/ul y un CMB de 15  $\mu$ g/ul , valores menores y muy diferente a lo encontrado por nosotros, donde obtuvimos un CMI de 16,7 mg/ $\mu$ l y un CMB de 17,4  $\mu$ g/ml del extracto etanólico de la corteza de la granada frente al *Streptococcus mutans*, sin embargo en ambos trabajos se demuestra la mayor efectividad antimicrobiana.

Según el estudio por **Álvarez L**, (24). Demostró el efecto inhibitorio del extracto etanólico de la Granada y Guayaba. Encontrándose el halo promedio de 7,675 mm, en concentración desde el 12,5% al 100%. de la granada sobre el *Streptococcus mutans*. Nuestros resultados al contrario mostraron un halo inhibitorio de 16,64 mm al 25,46 mm en volúmenes de 17,5 ul al 30 ul. Realizando la comparación, se apreció una diferencia significativa, siendo mi estudio con mayor resultado en cuanto al efecto antimicrobiano del extracto etanólico sobre el *Streptococcus mutans*. Ambos estudios demuestran la efectividad antimicrobiana de la granada.

Según el estudio por **Serquén L, et al**, (23) de igual modo pusieron a prueba el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de cáscara de Púnica Granatum, pero en este caso frente a la *Cándida Albicans*, muy frecuente también en la cavidad bucal, y nos demuestra ser una alternativa a la prevención de la caries dental. Su halo de inhibición mayor fue en la concentración de 250 mg/ml de 28,33 mm. Comparando con mi trabajo se obtuvo un halo de inhibición mayor en el volumen e 30 ul de 25,46 mm. Siendo que el extracto etanólico tuvo mayores resultados frente a la *Cándida Albicans* que *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Como este estudio, existen otros autores que refieren la efectividad principalmente del extracto etanólico; más sin embargo no se ha

encontrado estudios que comparen con el extracto acuoso frente la *Porphyromonas gingivalis*, en todo caso nuestros resultados indican ser más efectivos frente al a *Porphyromonas gingivalis*.

Las limitaciones de mi estudio el adquirir el cultivo de cepas bacterianas, se tuvo que realizar la compra en laboratorio fuera de la ciudad. Para la realización de este trabajo de investigación experimental se tuvo que considerar con la ayuda de un microbiólogo de guía, materiales y previo conocimiento acerca del uso y manejo de materiales del laboratorio; sin embargo, se realizó satisfactoriamente el trabajo, donde adquirí la habilidad y destreza del método de Kirby - Bauer, así como también los métodos y medios para cultivo.

## CAPITULO IX

### CONCLUSIONES

- ✓ El efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la *Púnica Granatum* (Granada) demostró efecto antimicrobiano sobre ambas bacterias, siendo el de mayor efecto antimicrobiano para la *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™ (14,33mm – 18,1544mm) que para el *Streptococcus mutans* ATCC® 25175 (9,2069mm – 14,2869mm).
- ✓ El efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la corteza de la *Púnica Granatum* (Granada) demostró efecto antimicrobiano sobre ambas bacterias, siendo el de mayor efecto antimicrobiano para el *Streptococcus mutans* ATCC® 25175 (16,6418 mm – 25,4625mm) que para la *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™ (14,5613mm – 21,4725mm).
- ✓ La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de la corteza de la *Púnica Granatum* (Granada), donde fue mayor para *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ (8,69 mg/μl) como para *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ (5,45 mg/μl) en comparación con el extracto etanólico que fue mayor para *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ (17,7mg/) que *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ (16,7 mg/μl).
- ✓ La concentración bactericida (CMB) del extracto acuoso de la corteza de la *Púnica Granatum* (Granada), donde fue mayor para *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ (8,87 mg/μl) como para *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ (5,64 mg/μl) en comparación con el extracto etanólico fue mayor para *Porphyromonas gingivalis* ATCC® 33277™ (18,44 mg/) que *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ (17,4 mg/μl).
- ✓ Se determinó que el extracto etanólico de la corteza de la *Púnica Granatum* (Granada) tiene mayor efecto antimicrobiano que el extracto acuoso de la misma corteza, con un valor medio mínimo de 14,5613 mm de diámetro de halo de inhibición para el volumen de 17,5μl y un valor medio máximo de 25,4625 mm para el volumen de 30μl.

## **CAPÍTULO X**

### **RECOMENDACIONES**

- ✓ Se recomienda seguir con los estudios en base de resultados obtenidos del extracto acuoso y etanólico de la púnica Granatum para las pruebas “in vivo” en animales.
- ✓ Se recomienda a la Escuela Profesional de Odontología enfocar más investigaciones, pero en animales e in vivo.
- ✓ Se recomienda a la Escuela Profesional de Odontología fomentar la vinculación de la universidad-empresa para elaborar productos en diversas presentaciones del extracto etanólico de la Púnica Granatum dirigido a pacientes odontológicos, generando patentes.
- ✓ Se recomienda a la comunidad científica profundizar la efectividad del extracto de la púnica Granatum frente a otros microorganismos.

## CAPITULO XI

### BIBLIOGRAFÍA

1. Galindo C. ¿Qué bacterias hay en la boca? [Internet]. Dental Galindo. 2020 [citado 1 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.dentalgalindo.com/blog/bacterias-de-la-boca/>
2. Gulube Z, Patel M. Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. Microb Pathog. septiembre de 2016;98:45-9.
3. Mayor Hernández F, Pérez Quiñones JA, Cid Rodríguez M del C, Martínez Brito I, Martínez Abreu J, Moure Ibarra MD. La caries dental y su interrelación con algunos factores sociales. Revista Médica Electrónica. junio de 2014;36(3):339-49.
4. Orrego-Cardozo M, Parra-Gil MA, Salgado-Morales YP, Muñoz-Guarín E, Fandiño-Henao V. Porphyromonas gingivalis y enfermedades sistémicas. CES Odontología. junio de 2015;28(1):57-73.
5. Aparecida Procópio Gomes L, Alves Figueiredo LM, Luiza do Rosário Palma A, Corrêa Geraldo BM, Isler Castro KC, Ruano de Oliveira Fugisaki L, et al. Punica granatum L. (Pomegranate) Extract: In Vivo Study of Antimicrobial Activity against Porphyromonas gingivalis in Galleria mellonella Model. ScientificWorldJournal. 2016;2016:8626987.
6. Nereyda E, Saucedo R. USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES EN LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS. 2011;7.
7. Bassiri-Jahromi S, Doostkam A. Punica granatum L. (pomegranate): A Potential Anti-Microbial Agent. Anti-Infective Agents. 15 de febrero de 2019;17.
8. Martínez LL, Cortés M del CG, Alej, Rodríguez ra WH, Sierra EMS, Luna MAL, et al. La caries, gingivitis, periodontitis y la maloclusión siguen siendo las afecciones estomatológicas más frecuentes en la población. Archivos de Medicina [Internet]. 2013 [citado 20 de mayo de 2021];9(4). Disponible en: <https://www.archivosdemedicina.com/abstract/la-caries-gingivitisperiodontitisy-la-maloclusinsiguen-siendolas-afeccionesestomatologicasms-frecuentes-enla-poblacin-609.html>
9. Salud bucodental [Internet]. [citado 14 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
10. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. Immunol Lett. diciembre de 2014;162(2 Pt A):22-38.
11. Pardo Romero FF, Hernández LJ. Enfermedad periodontal: enfoques epidemiológicos para su análisis como problema de salud pública. Rev salud pública. abril de 2018;20:258-64.
12. Oromí Durich J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Med Integr. 1 de diciembre de 2000;36(10):367-70.

13. AUTOMEDICACION\_junio\_2008.pdf [Internet]. [citado 21 de mayo de 2021]. Disponible en:  
[http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/AUTOMEDICACION\\_junio\\_2008.pdf](http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/AUTOMEDICACION_junio_2008.pdf)
14. Turizo AIC, Perez LMJ. ESENCIALES (Eugenia Caryophyllata Thunberg “CLAVO DE OLOR” Citrus Tangerina “MANDARINA” Y Ocimum Basilicum “ALBAHACA”) SOBRE.
15. Brookes ZLS, Bescos R, Belfield LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *J Dent.* diciembre de 2020;103:103497.
16. Bassiri-Jahromi S, Doostkam A. Punica granatum L. (pomegranate): A Potential Anti-Microbial Agent. *Anti-Infective Agents.* 15 de febrero de 2019;17.
17. Hajifattahi F, Moravej-Salehi E, Taheri M, Mahboubi A, Kamalinejad M. Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of Punica granatum Linn. Petal on Common Oral Microorganisms. *Int J Biomater* [Internet]. 2016 [citado 21 de mayo de 2021];2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4738741/>
18. Naik P, Metgud R, Kaderi M, Asem S. ASSESSMENT AND COMPARISON OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PUNICA GRANATUM WITH CHLORHEXIDINE AGAINST PORPHYROMONAS GINGIVALIS, PREVOTELLA INTERMEDIA, AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS: AN IN VITRO STUDY. :3.
19. Nayak SB, Rodrigues V, Maharaj S, Bhogadi VS. Wound healing activity of the fruit skin of Punica granatum. *J Med Food.* septiembre de 2013;16(9):857-61.
20. Lansky EP, Newman RA. Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 19 de enero de 2007;109(2):177-206.
21. Millo G, Juntavee A, Ratanathongkam A, Nualkaew N, Peerapattana J, Chatchiwattana S. Antibacterial Inhibitory Effects of Punica Granatum Gel on Cariogenic Bacteria: An in vitro Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2017;10(2):152-7.
22. Ferrazzano GF, Scioscia E, Sateriale D, Pastore G, Colicchio R, Pagliuca C, et al. In Vitro Antibacterial Activity of Pomegranate Juice and Peel Extracts on Cariogenic Bacteria. *Biomed Res Int.* 2017;2017:2152749.
23. Serquén LM, Mantilla MCM, Osoreo SAI. Susceptibilidad de «candida albicans» a extracto etanólico de cáscara de «punica granatum». *Medicina naturista.* 2020;14(1):59-64.
24. Álvarez Lorenzo M. Comparación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de la Psidium Guajava (guayaba) y Punica Granatum (granada) sobre el Streptococcus Mutans estudio in vitro. 2018.
25. Coronado-Reyes JA, Cortés-Penagos C de J, González-Hernández JC. Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (Punica granatum): a review. *Food Sci Technol* [Internet]. 22 de febrero de 2021 [citado 14 de mayo de 2021]; Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612021005005204&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612021005005204&tlng=en)

26. Rojas-Rodríguez F, Torres-Córdoba G. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Granada (*Punica granatum* L). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*; Vol 14, Núm 35 (2017); 84-86 [Internet]. 19 de septiembre de 2017 [citado 30 de mayo de 2021]; Disponible en: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/8455>
27. Aguilera-Arango G, Lombo-Ortiz D, Burbano E, Orduz J. Pomegranate (*Punica granatum* L.), a crop with productive potential: Review and situation in Colombia. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 25 de marzo de 2020;23:#27.
28. Viuda-Martos M, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010;9(6):635-54.
29. Coronado-Reyes JA, Cortés-Penagos C de J, González-Hernández JC, Coronado-Reyes JA, Cortés-Penagos C de J, González-Hernández JC. Chemical composition and great applications to the fruit of the pomegranate (*Punica granatum*): a review. *Food Science and Technology* [Internet]. 2021 [citado 14 de mayo de 2021];(AHEAD). Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0101-20612021005005204&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0101-20612021005005204&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
30. Vilca M, Henry O. Efecto antibacteriano del extracto acuoso y etanólico de la *Caesalpinia Spinosa* (tara) sobre el *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 - estudio in vitro Tacna 2020. Universidad Privada de Tacna [Internet]. 2020 [citado 30 de mayo de 2021]; Disponible en: <http://localhost:8080/xmlui/handle/UPT/1634>
31. Azaña B, Gustavo L. Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Punica granatum* linn “granada” sobre cepas de *Candida albicans*. Universidad Nacional de Trujillo [Internet]. 10 de enero de 2020 [citado 27 de mayo de 2021]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/15578>
32. Reynoso VMG, Morales AGG, Soto CGM, Gurza MER, Quintero EL. Epidemiología de caries dental y factores de riesgo asociados a la dentición primaria en preescolares. *Rev ADM*. 2009;66(3):10-20.
33. Nishikawara F, Nomura Y, Imai S, Senda A, Hanada N. Evaluation of Cariogenic Bacteria. *Eur J Dent*. enero de 2007;1(1):31-9.
34. González Sanz ÁM, González Nieto BA, González Nieto E. Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. *Nutrición Hospitalaria*. julio de 2013;28:64-71.
35. Basso ML. Conceptos actualizados en cariología. *Rev Asoc Odontol Argent*. 2019;25-32.
36. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES Odontología*. enero de 2013;26(1):44-56.
37. ITIS Standard Report Page: *Streptococcus mutans* [Internet]. [citado 30 de mayo de 2021]. Disponible en: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=966483#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=966483#null)
38. Lordelo MJ. El tabaco y su influencia en el periodonto. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. abril de 2005;17(1):17-24.

39. Perfecto DR, Nakata HM, Cadillo EM. Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontología Sanmarquina*. 18 de julio de 2011;14(1):34-8.
40. Díaz Caballero A, Vivas Reyes R, Puerta Llerena L, Ahumado Monterrosa M, Cabrales Salgado R, Herrera Herrera A, et al. Periodontitis, Porphyromonas gingivalis y su relación con la expresión de quorum sensing. *Revista Cubana de Estomatología*. diciembre de 2010;47(4):404-16.
41. Díaz Zúñiga J, Yáñez Figueroa J, Melgar Rodríguez S, Álvarez Rivas C, Rojas Lagos C, Vernal Astudillo R. Virulencia y variabilidad de Porphyromonas gingivalis y Aggregatibacter actinomycetemcomitans y su asociación a la periodontitis. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. abril de 2012;5(1):40-5.
42. Ramos Perfecto D, Nakata HM, Cadillo EM. Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontol Sanmarquina*. 18 de julio de 2011;14(1):34-8.
43. Muñoz Cabana MY, Santa Cruz Lopéz KG. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de punica granatum (granada) en cepas de pseudomonas aeruginosa y staphylococcus aureus. *Repositorio Institucional - UIGV [Internet]*. 12 de julio de 2018 [citado 16 de julio de 2021]; Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2857>
44. Bustamante OC, Troncos LGP, Zebrauskas APP de, Leandro KCR, Sime CL del CH. ANTISÉPTICOS ORALES: CLORHEXIDINA, FLÚOR Y TRICLOSÁN. *Salud & Vida Sipanense*. 28 de junio de 2020;7(1):4-16.
45. Herrera ML. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr Carlos Sáenz Herrera*. enero de 1999;34:33-41.
46. Definición de cepa de organismos - *Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]*. 2011 [citado 15 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/cepa-de-organismos>
47. Tomas Agurto Saenz. *Manual de técnicas de microbiología*. 1ed. Lima: Universidad Ricardo Palma. 1989.
48. Stephen J. Cavalieri. *Manual de pruebas de sensibilidad antimicrobiana*. 1ed. Marie B. Coyle:

## **CAPÍTULO XII**

### **ANEXOS**

# **ANEXOS**

## ANEXOS

|  |     |
|--|-----|
| Anexo 1, Matriz de consistencia .....  | 94  |
| Anexo 2, Instrumentos de recolección de datos .....  | 96  |
| Anexo 3, Proceso de Validación de Instrumentos.....  | 101 |
| Anexo 4, Constancia de Comité de ética.....  | 102 |
| Anexo 5, Resultados de análisis de cromatografía del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum ..... | 103 |
| Anexo 6, Diagrama .....  | 106 |
| Anexo 7, Recolección de datos .....  | 107 |
| Anexo 8. Galería fotográfica.....  | 116 |

Anexo 1, Matriz de consistencia

| PROBLEMA  | OBJETIVO  | HIPÓTESIS   | VARIABLE   | METODOLOGÍA  |
|---|---|---|--|--|
| <p><b>Problema General</b></p> <p>¿Cuál de los dos extractos de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) presenta mayor efecto antimicrobiano sobre la <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>?</p> | <p><b>Objetivo General</b></p> <p>Comparar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso y etanólico de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p><b>Objetivos Específicos</b></p> <p>Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de la corteza de la Púnica Granatum (Granada) en volúmenes de 30ul; 27,5ul; 25ul; 22.5ul; 20ul; 17.5ul sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>Evaluar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de la</p> | <p><b>Hipótesis general</b></p> <p>H0:</p> <p>El extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) no presenta efecto antimicrobiano frente a las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>H1:</p> <p>El extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) si presenta efecto antimicrobiano frente a las cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>.</p> | <p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p>EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE LA PUNICA GRANATUM (GRANADA).</p> <p><b>VARIABLE DEPENDIENTE</b></p> <p>LA <i>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</i> ATCC 33277 Y <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> ATCC 25175.</p> | <p><b>Diseño de investigación</b></p> <p>El presente estudio es de diseño experimental.</p> <p><b>Tipo de investigación</b></p> <p>Experimental, transversal, prospectivo, analítico e in vitro.</p> <p><b>Ámbito de estudio</b></p> <p>El proyecto de investigación se desarrolló en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, en la Facultad de Ciencias de la Salud, en el laboratorio de Microbiología.</p> <p><b>Unidad de estudio</b></p> <p>Placas Petris con cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 en la cual se le aplicaron discos con diferentes volúmenes de extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada).</p> |

| PROBLEMA | OBJETIVO   | HIPÓTESIS | VARIABLE | METODOLOGÍA   |
|----------|--|-----------|----------|---|
|          | <p>corteza de la Púnica Granatum (Granada) en volúmenes de 30ul; 27,5ul; 25ul; 22,5ul; 20ul; 17,5ul sobre <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) sobre la <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum (Granada) sobre la <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i>.</p> |           |          | <p><b>Grupo control</b></p> <p>-Grupo control positivo: Clorhexidina al 0,12%</p> <p>-Grupo control negativo: Agua destilada</p> <p><b>Tamaño de muestra</b></p> <p>Estuvo representado por 2 tipos de cepas: <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 y <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 a 6 volúmenes (30ul; 27,5ul; 25ul; 22,5ul; 20ul; 17,5ul) del extracto etanólico y acuoso de la cáscara de Púnica Granatum, (Granada) y se consideró 8 repeticiones.</p> |

## Anexo 2, Instrumentos de recolección de datos

A. Ficha de recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto acuoso de corteza de *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| <i>Streptococcus mutans</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-------------|--|
| Volumen (µl)                | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        |  | Media | 2da, Repetición |  | Media | 3ra, Repetición |  | Media | 4ta, Repetición |  | Media | 5ta, Repetición |  | Media | 6ta, Repetición |  | Media | 7ma, Repetición |  | Media | 8va, Repetición |  | Media | MEDIA TOTAL |  |
| 30                          |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 27,5                        |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 25                          |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 22,5                        |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 20                          |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 17,5                        |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| Control Negativo            |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| Control Positivo (CHX)      |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |

B. Ficha de recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto acuoso de corteza de *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

| <i>Porphyromonas gingivalis</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|--|-------|-------------|--|
| Volumen (µl)                    | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        |  | Media | 2da, Repetición |  | Media | 3ra, Repetición |  | Media | 4ta, Repetición |  | Media | 5ta, Repetición |  | Media | 6ta, Repetición |  | Media | 7ma, Repetición |  | Media | 8va, Repetición |  | Media | MEDIA TOTAL |  |
| 30                              |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 27,5                            |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 25                              |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 22,5                            |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 20                              |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| 17,5                            |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| Control Negativo                |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |
| Control Positivo (CHX)          |                       |                        |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |                 |  |       |             |  |

C. Ficha de recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de corteza de *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| <i>Streptococcus mutans</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-------------|--|
| Volumen (µl)                | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        | Media | 2da, Repetición | Media | 3ra, Repetición | Media | 4ta, Repetición | Media | 5ta, Repetición | Media | 6ta, Repetición | Media | 7ma, Repetición | Media | 8va, Repetición | Media | MEDIA TOTAL |  |
| 30                          |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 27,5                        |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 25                          |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 22,5                        |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 20                          |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 17,5                        |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| Control Negativo            |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| Control Positivo (CHX)      |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |

D. Ficha de recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de corteza de *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

| <i>Porphyromonas gingivalis</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
|---------------------------------|-----------------------|------------------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-----------------|-------|-------------|--|
| Volumen (µl)                    | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        | Media | 2da, Repetición | Media | 3ra, Repetición | Media | 4ta, Repetición | Media | 5ta, Repetición | Media | 6ta, Repetición | Media | 7ma, Repetición | Media | 8va, Repetición | Media | MEDIA TOTAL |  |
| 30                              |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 27,5                            |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 25                              |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 22,5                            |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 20                              |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| 17,5                            |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| Control Negativo                |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |
| Control Positivo (CHX)          |                       |                        |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |                 |       |             |  |

E. *Ficha para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de la Púnica Granatum sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175.*

| <i>Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso para Streptococcus mutans ATCC 25175</i> |                           |                        |                  |                      |
|--|---------------------------|------------------------|------------------|----------------------|
| <b>TUBO</b>  | <b>CONCENTRACIÓN (mg)</b> | <b>EXTRACTO (Vol.)</b> | <b>BHIB (ul)</b> | <b>BACTERIA (ul)</b> |
| T1   |                           |                        |                  |                      |
| T2   |                           |                        |                  |                      |
| T3   |                           |                        |                  |                      |
| T4   |                           |                        |                  |                      |
| T5   |                           |                        |                  |                      |
| T6   |                           |                        |                  |                      |
| T7   |                           |                        |                  |                      |
| T8   |                           |                        |                  |                      |
| T9   |                           |                        |                  |                      |
| T +  |                           |                        |                  |                      |
| T -  |                           |                        |                  |                      |

F. *Ficha para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de la Púnica Granatum sobre el Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.*

| <i>Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso para Porphyromonas gingivalis ATCC 33277</i> |                           |                        |                 |                      |
|--|---------------------------|------------------------|-----------------|----------------------|
| <b>TUBO</b>  | <b>CONCENTRACIÓN (mg)</b> | <b>EXTRACTO (Vol.)</b> | <b>BHIB(ul)</b> | <b>BACTERIA (ul)</b> |
| T1   |                           |                        |                 |                      |
| T2   |                           |                        |                 |                      |
| T3   |                           |                        |                 |                      |
| T4   |                           |                        |                 |                      |
| T5   |                           |                        |                 |                      |
| T6   |                           |                        |                 |                      |
| T7   |                           |                        |                 |                      |
| T8   |                           |                        |                 |                      |
| T9   |                           |                        |                 |                      |
| T +  |                           |                        |                 |                      |
| T -  |                           |                        |                 |                      |

G. Ficha para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la Púnica Granatum sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| <i>Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso para Streptococcus mutans ATCC 25175</i> |                    |                 |           |               |
|--|--------------------|-----------------|-----------|---------------|
| TUBO   | CONCENTRACIÓN (mg) | EXTRACTO (Vol.) | BHIB (ul) | BACTERIA (ul) |
| T1   |                    |                 |           |               |
| T2   |                    |                 |           |               |
| T3   |                    |                 |           |               |
| T4   |                    |                 |           |               |
| T5   |                    |                 |           |               |
| T6   |                    |                 |           |               |
| T7   |                    |                 |           |               |
| T8   |                    |                 |           |               |
| T9   |                    |                 |           |               |
| T +  |                    |                 |           |               |
| T -  |                    |                 |           |               |

H. Ficha para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la Púnica Granatum sobre el *Porphyromona gingivalis* ATCC 33277.

| <i>Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto acuoso para Porphyromona gingivalis ATCC 33277</i> |                    |                 |           |               |
|---|--------------------|-----------------|-----------|---------------|
| TUBO  | CONCENTRACIÓN (mg) | EXTRACTO (Vol.) | BHIB (ul) | BACTERIA (ul) |
| T1  |                    |                 |           |               |
| T2  |                    |                 |           |               |
| T3  |                    |                 |           |               |
| T4  |                    |                 |           |               |
| T5  |                    |                 |           |               |
| T6  |                    |                 |           |               |
| T7  |                    |                 |           |               |
| T8  |                    |                 |           |               |
| T9  |                    |                 |           |               |
| T +   |                    |                 |           |               |
| T -   |                    |                 |           |               |

- I. *Ficha de recolección de datos para la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 y Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.*

| <i>Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i> |                           |                       |
|---|---------------------------|-----------------------|
| <b>TUBO</b>   | <b>CONCENTRACIÓN (mg)</b> | <b>Turbidez (+/-)</b> |
| T1  |                           |                       |
| T2  |                           |                       |
| T3  |                           |                       |
| T4  |                           |                       |
| T5  |                           |                       |
| T6  |                           |                       |
| T7  |                           |                       |
| T8  |                           |                       |
| T9  |                           |                       |
| T +   |                           |                       |
| T -   |                           |                       |

- J. *Ficha para la determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso de la Púnica Granatum sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 y Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.*

| <i>Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI)</i> |                           |  |
|---|---------------------------|--|
| <b>N° TUBO (TURBIDEZ +)</b>                                       | <b>CONCENTRACIÓN (mg)</b> | <b>UFC (unidades formadoras de colonias)</b> |
|   |                           |  |
|   |                           |  |
|   |                           |  |

### **Anexo 3, Proceso de Validación de Instrumentos**

No es necesario en mi proyecto de tesis.

## Anexo 4, Constancia de Comité de ética

|   |                                  |                                  |                     |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|
|  | UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA     | FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD | CODIGO: 87/FACSA/UI |
|   | COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION |                                  | Hoja 1 de 1         |

### CONSTANCIA

El que suscribe, presidente del comité institucional de ética en investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, deja constancia que el proyecto de investigación titulado "EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE LA PUNICA GRANATUM (GRANADA) SOBRE LA PORPHYROMONA GINGIVALIS ATCC 33277 Y STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175- ESTUDIO IN VITRO. TACNA, 2021", ha sido evaluado y aprobado por nuestro comité, no habiéndose encontrado objeciones en dicho proyecto de acuerdo a los estándares propuestos. Dicha investigación fue presentada por el investigador(a) Fiorella Elizabeth Altamirano Quispe

La fecha de aprobación tendrá vigencia desde el 15 de marzo del 2022 hasta el 14 de marzo del 2023.

Asimismo, le solicitamos hacer llegar el informe de ejecución del proyecto; e informará en caso necesario, los riesgos desfavorables, el rechazo de participación de los sujetos, el número de participantes enrolados y/o cualquier antecedente importante que se observe durante la ejecución de la investigación.

Tacna, 15 de marzo del 2022



\_\_\_\_\_  
Presidente  
Comité Institucional de Ética en investigación

Anexo 5, Resultados de análisis de cromatografía del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO  
 FACULTAD DE CIENCIAS  
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad  
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Cusco, 05 de Julio del 2022<sup>-34</sup>

Solicitante : Fiorela Elizaceth Altamirano Quispe  
 Universidad Privada de Tacna  
 Tipo de Análisis : Marcha Fitoquímica y Perfil de compuestos Fenólicos  
 Método de Análisis : Reacciones a la gota y Cromatografía líquida  
 Tipo de Muestras : Denominado "Extracto Acuoso y etanólico de Cascara de Granada"  
 Cantidad de Muestra : 2, Frasco con un Solido naranja aprox 2gr de cada uno  
 Almacenamiento : 4 °C.

Ensayo fitoquímico

| Muestra                                  | Compuestos Fenólicos | Flavonoides | Alcaloides | Triterpenos y Esteroides | Saponinas | Taninos | Quinonas |
|--|----------------------|-------------|------------|--------------------------|-----------|---------|----------|
| Extracto Acuoso de Cascara de Granada    | +++                  | +           | -          | -                        | -         | +++     | -        |
| Extracto Etanólico de Cascara de Granada | +++                  | ++          | -          | -                        | -         | +++     | -        |

Abundante = +++, Poco = ++, Muy Poco = +, Ausente = -

Nota:

El ensayo fitoquímico realizado al extracto consistió en reacciones de coloración y/o precipitación, en el que se evaluó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios

Referencia

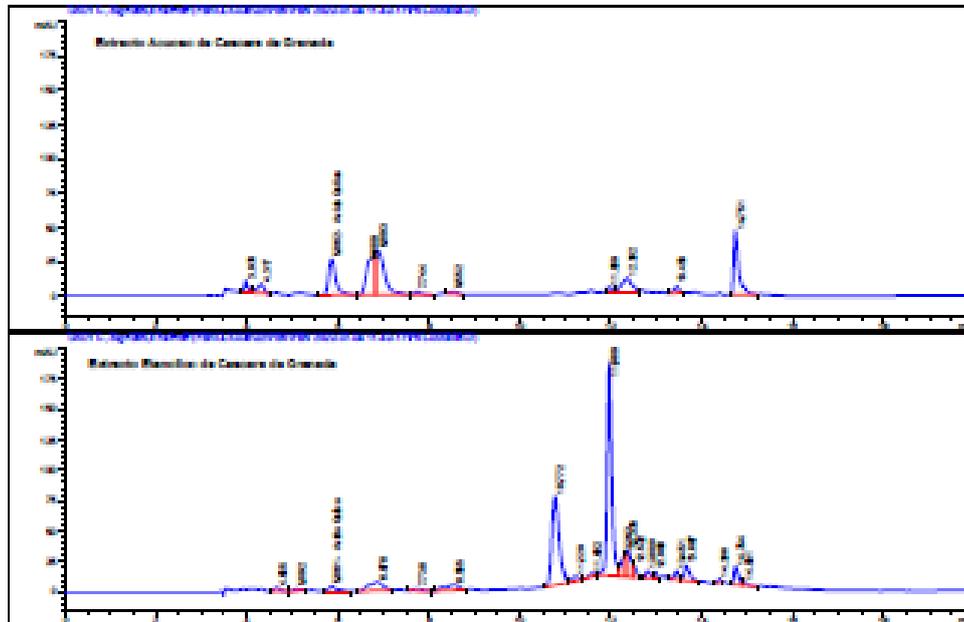
- Lock de Ugaz O. 1994. "Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio en los productos naturales" Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.



*[Handwritten Signature]*  
 Químico, Jorge Choquenaira Pari  
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría - UNSAAC.  
 CQP - 914



### RESULTADOS



| Muestra                                  | Repeticiones |         |         | Promedio<br>Fenolicos Totales<br>mg/gr extracto |
|--|--------------|---------|---------|---|
|  | 1            | 2       | 3       |   |
| Extracto Acuoso de Cascara de Granada    | 8.5697       | 8.5374  | 8.6708  | 8.6   |
| Extracto Etanólico de Cascara de Granada | 38.6033      | 38.9701 | 38.9298 | 38.8  |

| Muestra                                  | Repeticiones |        |        | Acido Galico<br>mg/gr extracto |
|--|--------------|--------|--------|--------------------------------|
|  | 1            | 2      | 3      |                                |
| Extracto Acuoso de Cascara de Granada    | 1.3659       | 1.3560 | 1.3949 | 1.4                            |
| Extracto Etanólico de Cascara de Granada | 0.5076       | 0.4700 | 0.4707 | 0.5                            |

**Nota:**

Se ha detectado la presencia de 14 compuestos, se ha evidenciado la presencia de ácido Galico por la comparación del espectro ultravioleta de la muestra y el estándar, la cantidad de ácido galico presente en la muestra se determino mediante una curva de calibración con un estándar de ácido Galico. La cantidad de compuestos fenolicos es la suma total de los compuestos hallados en mg/gr de extracto



  
 Quirico Jorge Chiquanaira Pari  
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
 Espectrometría - UNSAAC.  
 GQP - 914



## RESULTADOS

### Condiciones de Análisis por HPLC

|                        |  |
|------------------------|--|
| Cromatógrafo:          | Agilent series 1200  |
| Software:              | Chemstation V03.02   |
| Columna:               | Zorbax Eclipse XDB C18 4.6d x 250mm, 5um                           |
| Pre Columna:           | Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5um                        |
| Flujo:                 | 0.800 ml/min.  |
| Solvente A:            | 95.0 % H <sub>2</sub> O, 0.1%                                      |
| Solvente B:            | 5.0 % MeCN   |
| Sistema de Análisis:   | De 0 a 2 min 5.0% B, a 6 min 10% B, a 15 min 50% B, 20 min 50% B.. |
| Detección DAD:         | 285 nm   |
| Temperatura del Horno: | 40.0°C   |
| Tiempo de Análisis:    | 20 min.  |
| Volumen de Inyección:  | 1.0 µl   |

### Referencia

1. Vrchotová, N & Sera, Bozena & Triska, Jan. (2007). The stilbene and catechin content of the spring sprouts of *Reynoutria* species. *ACTA Chromatographica*. 19.
2. Cjuno Q., Ugarda K. 2013 Cuantificación de Acido Rosmarínico en Sals Plantas Cusqueñas de la Tribu Methear (Lamiaceae) por HPLC – DAD Tesis UNSAAC.
3. Ivanescu, B., Vlase, L., Corclova, A., & Lazar, M. I. (2010). HPLC-DAD-MS study of polyphenols from *Artemisia absinthium*, *A. annua*, and *A. vulgaris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(3), 468-470. <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9648-8>

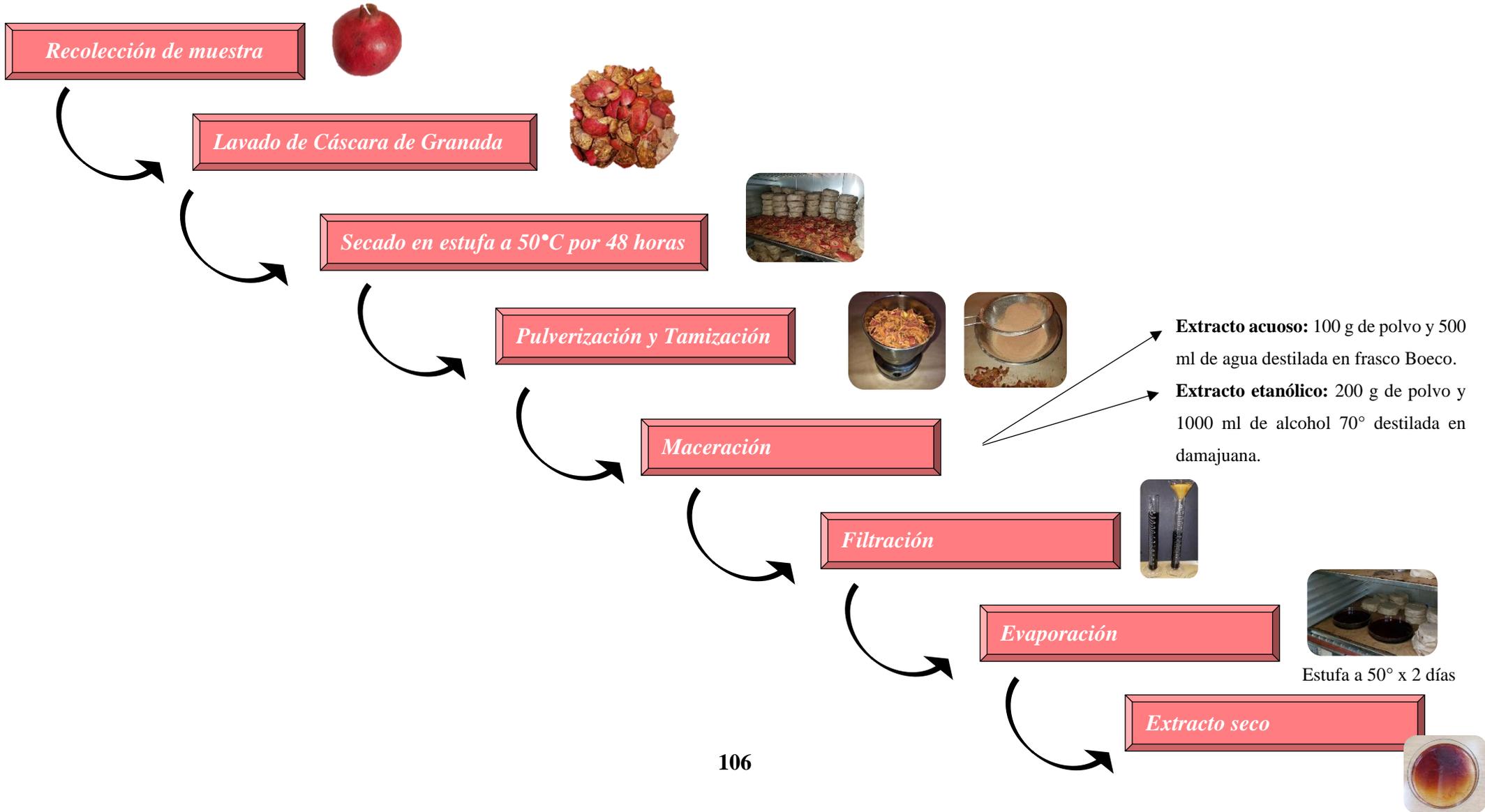




Químico, Jorge Chesquena Pari  
Analista del Laboratorio de Cromatografía y  
Espectrometría – UNSAAC.  
GGP-914

Anexo 6, Diagrama

A. Diagrama de obtención del principio activo del extracto acuoso y etanólico de la *Púnica Granatum*.



## Anexo 7, Recolección de datos

### A. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto acuoso de corteza de *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

| <i>Streptococcus mutans</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |        |             |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|--------|--------|-------------|
| Volumen (µl)                | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        |       | Media  | 2da, Repetición |       | Media  | 3ra, Repetición |       | Media  | 4ta, Repetición |       | Media  | 5ta, Repetición |       | Media  | 6ta, Repetición |       | Media  | 7ma, Repetición |       | Media  | 8va, Repetición |        | Media  | MEDIA TOTAL |
| 30                          | 8,877                 | 14,53                  | 14,39 | 14,46  | 14,12           | 14,03 | 14,075 | 14,23           | 14,05 | 14,14  | 14,63           | 14,39 | 14,51  | 14,23           | 14,38 | 14,305 | 14,15           | 14,18 | 14,165 | 14,23           | 14,36 | 14,295 | 14,28           | 14,41  | 14,345 | 14,286875   |
| 27,5                        | 8,13725               | 13,5                   | 13,43 | 13,465 | 13,68           | 13,39 | 13,535 | 13,53           | 13,62 | 13,575 | 13,51           | 13,72 | 13,615 | 13,53           | 13,56 | 13,545 | 13,43           | 13,56 | 13,495 | 13,21           | 13,36 | 13,285 | 13,61           | 13,59  | 13,6   | 13,514375   |
| 25                          | 7,3975                | 12,99                  | 12,96 | 12,975 | 13,01           | 12,83 | 12,92  | 12,93           | 12,81 | 12,87  | 12,68           | 12,71 | 12,695 | 12,73           | 12,53 | 12,63  | 12,81           | 12,87 | 12,84  | 12,59           | 13,01 | 12,8   | 13,03           | 13,05  | 13,04  | 12,84625    |
| 22,5                        | 6,65775               | 12,48                  | 12,43 | 12,455 | 11,96           | 12,12 | 12,04  | 12,11           | 12,26 | 12,185 | 12,31           | 12,93 | 12,62  | 12,31           | 12,38 | 12,345 | 12,19           | 12,23 | 12,21  | 12,29           | 12,36 | 12,325 | 12,12           | 12,21  | 12,165 | 12,293125   |
| 20                          | 5,918                 | 10,39                  | 10,19 | 10,29  | 10,26           | 10,21 | 10,235 | 9,96            | 10,03 | 9,995  | 10,1            | 10,16 | 10,13  | 10,23           | 10,31 | 10,27  | 10,28           | 10,18 | 10,23  | 10              | 9,93  | 9,965  | 10,51           | 10,23  | 10,37  | 10,185625   |
| 17,5                        | 5,17825               | 9,62                   | 9,65  | 9,635  | 9,31            | 9,09  | 9,2    | 9,26            | 9,38  | 9,32   | 9,56            | 9,23  | 9,395  | 9,36            | 9,41  | 9,385  | 9,18            | 9,03  | 9,105  | 8,36            | 8,51  | 8,435  | 9,12            | 9,24   | 9,18   | 9,206875    |
| Control Negativo            |                       | 0                      |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |        |             |
| Control Positivo (CHX)      |                       | 14,82                  | 14,03 | 14,425 |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 | 14,425 |        |             |

### B. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto acuoso de corteza de *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Porphyromona gingivalis* ATCC 33277.

| <i>Porphyromona gingivalis</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |       |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |        |             |
|--------------------------------|-----------------------|------------------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|--------|--------|-------------|
| Volumen (µl)                   | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        |       | Media  | 2da, Repetición |       | Media  | 3ra, Repetición |       | Media  | 4ta, Repetición |       | Media | 5ta, Repetición |       | Media  | 6ta, Repetición |       | Media  | 7ma, Repetición |       | Media  | 8va, Repetición |        | Media  | MEDIA TOTAL |
| 30                             | 8,877                 | 18,39                  | 18,21 | 18,3   | 18,01           | 18,11 | 18,06  | 18,14           | 18,2  | 18,17  | 18,17           | 18,05 | 18,11 | 18,31           | 18,13 | 18,22  | 18,19           | 18,23 | 18,21  | 18,11           | 18,15 | 18,13  | 17,99           | 18,08  | 18,035 | 18,154375   |
| 27,5                           | 8,13725               | 17,43                  | 17,44 | 17,435 | 17,36           | 17,43 | 17,395 | 17,03           | 17,15 | 17,09  | 17,31           | 17,41 | 17,36 | 17,39           | 17,45 | 17,42  | 17,31           | 17,36 | 17,335 | 17,56           | 17,43 | 17,495 | 17,51           | 17,5   | 17,505 | 17,379375   |
| 25                             | 7,3975                | 17,01                  | 17,03 | 17,02  | 17,11           | 17,16 | 17,135 | 17,21           | 17,12 | 17,165 | 17,03           | 17,11 | 17,07 | 17,09           | 16,96 | 17,025 | 16,99           | 17,12 | 17,055 | 17,01           | 17    | 17,005 | 17,05           | 17,09  | 17,07  | 17,068125   |
| 22,5                           | 6,65775               | 16,99                  | 16,98 | 16,985 | 16,31           | 16,59 | 16,45  | 16,12           | 16,33 | 16,225 | 16,17           | 16,43 | 16,3  | 16,96           | 16,83 | 16,895 | 16,91           | 16,38 | 16,645 | 16,15           | 16,11 | 16,13  | 15,99           | 16,21  | 16,1   | 16,46625    |
| 20                             | 5,918                 | 15,41                  | 15,56 | 15,485 | 15,03           | 15,15 | 15,09  | 14,99           | 15,09 | 15,04  | 15,31           | 15,11 | 15,21 | 15,63           | 15,34 | 15,485 | 15,36           | 15,39 | 15,375 | 15,41           | 15,35 | 15,38  | 15,16           | 15,23  | 15,195 | 15,2825     |
| 17,5                           | 5,17825               | 13,54                  | 13,26 | 13,4   | 15,61           | 14,93 | 15,27  | 15,04           | 14,96 | 15     | 13,92           | 13,42 | 13,67 | 14,15           | 14,21 | 14,18  | 14,48           | 14,56 | 14,52  | 14,07           | 14,18 | 14,125 | 14,93           | 14,02  | 14,475 | 14,33       |
| Control Negativo               |                       | 0                      |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |       |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |        |             |
| Control Positivo (CHX)         |                       | 23,18                  | 20,81 | 21,995 |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |       |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 | 21,995 |        |             |

**C. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de la corteza de la *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.**

| <i>Streptococcus mutans</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |           |             |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|--------|-----------|-------------|
| Volumen (µl)                | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        |       | Media  | 2da, Repetición |       | Media  | 3ra, Repetición |       | Media  | 4ta, Repetición |       | Media  | 5ta, Repetición |       | Media  | 6ta, Repetición |       | Media  | 7ma, Repetición |       | Media  | 8va, Repetición |        | Media     | MEDIA TOTAL |
| 30                          | 32,199                | 25,26                  | 25,19 | 25,225 | 25,16           | 25,54 | 25,35  | 25,62           | 25,76 | 25,69  | 26,06           | 25,08 | 25,57  | 24,95           | 24,84 | 24,895 | 26,23           | 26,1  | 26,165 | 25,83           | 26,51 | 26,17  | 25,08           | 24,19  | 24,635    | 25,4625     |
| 27,5                        | 29,51575              | 23,12                  | 22,61 | 22,865 | 22,15           | 22,91 | 22,53  | 23,13           | 23,07 | 23,1   | 23,02           | 22,65 | 22,835 | 22,69           | 23,21 | 22,95  | 23,365          | 23,24 | 23,4   | 23,32           | 22,65 | 22,07  | 22,36           |        | 22,915625 |             |
| 25                          | 26,8325               | 21,31                  | 21,02 | 21,165 | 20,58           | 20,84 | 20,71  | 20,56           | 21,08 | 20,82  | 21,24           | 21,84 | 21,54  | 20,4            | 21,35 | 20,875 | 20,73           | 20,65 | 20,69  | 20,66           | 20,95 | 20,805 | 20,36           | 20,64  | 20,5      | 20,888125   |
| 22,5                        | 24,14925              | 21,71                  | 19,99 | 20,85  | 19,98           | 19,75 | 19,865 | 19,54           | 19,39 | 19,465 | 19,58           | 19,31 | 19,445 | 20,02           | 20    | 20,01  | 19,87           | 19,7  | 19,785 | 19,47           | 19,42 | 19,445 | 19,34           | 19,25  | 19,295    | 19,77       |
| 20                          | 21,466                | 17,97                  | 17,95 | 17,96  | 17,13           | 17,23 | 17,18  | 18,04           | 18,09 | 18,065 | 18,48           | 18,17 | 18,325 | 17,91           | 17,43 | 17,67  | 17,51           | 17,74 | 17,625 | 18,02           | 17,69 | 17,855 | 18,26           | 17,96  | 18,11     | 17,84875    |
| 17,5                        | 18,78275              | 16,64                  | 16,28 | 16,46  | 16,05           | 16,39 | 16,22  | 16,66           | 16,61 | 16,635 | 16,38           | 16,31 | 16,345 | 16,51           | 16,6  | 16,555 | 16,84           | 16,97 | 16,905 | 17,24           | 16,79 | 17,015 | 16,85           | 17,25  | 17,05     | 16,648125   |
| Control Negativo            |                       | <6                     |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |           |             |
| Control Positivo (CHX)      |                       | 16,28                  | 16,63 | 16,455 |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 | 16,455 |           |             |

**D. Recolección de datos sobre la sensibilidad bacteriana del extracto etanólico de corteza de *Púnica Granatum* (Granada) frente a *Porphyromona gingivalis* ATCC 33277.**

| <i>Porphyromona gingivalis</i> |                       | HALOS DE INHICIÓN (mm) |       |        |                 |       |        |                 |       |       |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |        |             |
|--------------------------------|-----------------------|------------------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|-------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|-------|--------|-----------------|--------|--------|-------------|
| Volumen (µl)                   | Concentración (mg/µl) | 1ra, Repetición        |       | Media  | 2da, Repetición |       | Media  | 3ra, Repetición |       | Media | 4ta, Repetición |       | Media  | 5ta, Repetición |       | Media  | 6ta, Repetición |       | Media  | 7ma, Repetición |       | Media  | 8va, Repetición |        | Media  | MEDIA TOTAL |
| 30                             | 32,199                | 19,15                  | 21,09 | 20,12  | 20,25           | 21,62 | 20,935 | 23,76           | 23,12 | 23,44 | 21,58           | 22,46 | 22,02  | 23,96           | 21,37 | 22,665 | 23,05           | 19,09 | 21,07  | 20,54           | 19,91 | 20,225 | 21,1            | 21,51  | 21,305 | 21,4725     |
| 27,5                           | 29,51575              | 21,08                  | 20,53 | 20,805 | 20,23           | 20,21 | 20,22  | 19,99           | 20,55 | 20,27 | 20,95           | 20,89 | 20,92  | 21,72           | 20,71 | 21,215 | 20,46           | 20,8  | 20,63  | 20,25           | 19,96 | 20,105 | 19,67           | 19,53  | 19,6   | 20,470625   |
| 25                             | 26,8325               | 17,58                  | 17,41 | 17,495 | 17,3            | 17,38 | 17,34  | 17,85           | 17,91 | 17,88 | 18,76           | 18,42 | 18,59  | 18,64           | 18,35 | 18,495 | 18,62           | 18,36 | 18,49  | 17,83           | 17,59 | 17,71  | 17,91           | 18,13  | 18,02  | 18,0025     |
| 22,5                           | 24,14925              | 15,99                  | 15,93 | 15,96  | 15,85           | 15,94 | 15,895 | 16,01           | 15,91 | 15,96 | 15,84           | 16,19 | 16,015 | 17,6            | 17,03 | 17,315 | 17,74           | 17,56 | 17,65  | 16,06           | 16,46 | 16,26  | 16,73           | 16,46  | 16,595 | 16,45625    |
| 20                             | 21,466                | 14,93                  | 14,91 | 14,92  | 14,81           | 15,59 | 15,2   | 15,35           | 15,19 | 15,27 | 14,93           | 15,15 | 15,04  | 16,13           | 16,05 | 16,09  | 16,19           | 15,49 | 15,84  | 15,18           | 14,99 | 15,085 | 14,78           | 14,59  | 14,685 | 15,26625    |
| 17,5                           | 18,78275              | 14,5                   | 14,66 | 14,58  | 14,87           | 14,64 | 14,755 | 14,79           | 14,89 | 14,84 | 14,01           | 14,87 | 14,44  | 14,99           | 14,15 | 14,57  | 14,23           | 14,06 | 14,145 | 14,93           | 14,1  | 14,515 | 14,36           | 14,23  | 14,295 | 14,5175     |
| Control Negativo               |                       | <6                     |       |        |                 |       |        |                 |       |       |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |        |        |             |
| Control Positivo (CHX)         |                       | 22,33                  | 21,54 | 21,935 |                 |       |        |                 |       |       |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 |       |        |                 | 21,935 |        |             |

E. *Sustracción de datos relevantes de los cuadros anteriores de los diferentes resultados obtenidos para la determinación del CMI y CMB del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada).*

| <b>EXTRACTO ACUOSO</b><br><i>Streptococcus mutans</i>                  |   |                                   |
|--|---|-----------------------------------|
| <b>Volumen</b><br><b>(<math>\mu</math>l)</b>                           | <b>Concentración</b><br><b>(mg/<math>\mu</math>l)</b>                                   | <b>MEDIA TOTAL</b><br><b>(mm)</b> |
| 30   | 8,877  | 14,286875                         |
| 27,5   | 8,13725   | 13,514375                         |
| 25   | 7,3975  | 12,84625                          |
| 22,5   | 6,65775   | 12,293125                         |
| 20   | 5,918   | 10,185625                         |
| 17,5   | 5,17825   | 9,206875                          |
| <b>Control Negativo</b>  | -   | 0                                 |
| <b>Control Positivo</b><br><b>CHX</b><br><b>(30 <math>\mu</math>l)</b> | -   | 14,425                            |

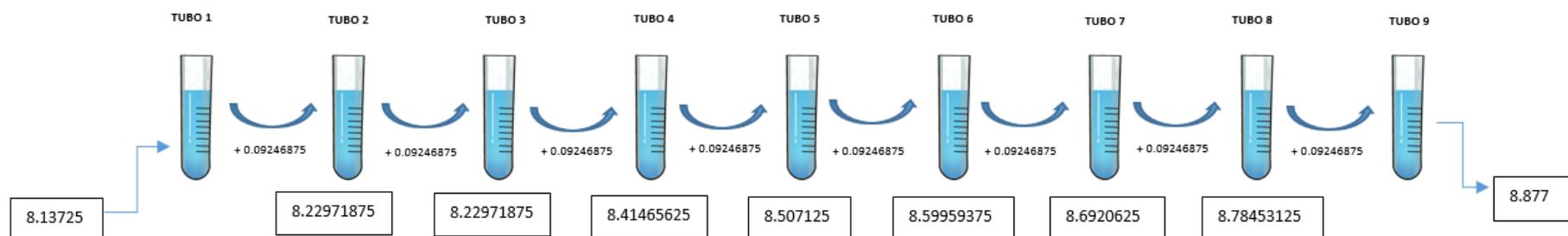
| <b>EXTRACTO ACUOSO</b><br><i>Porphyromona gingivalis</i>               |   |                                   |
|--|---|-----------------------------------|
| <b>Volumen</b><br><b>(<math>\mu</math>l)</b>                           | <b>Concentración</b><br><b>(mg/<math>\mu</math>l)</b>                                     | <b>MEDIA TOTAL</b><br><b>(mm)</b> |
| 30   | 8,877   | 18,1544375                        |
| 27,5   | 8,13725   | 17,379375                         |
| 25   | 7,3975  | 17,068125                         |
| 22,5   | 6,65775   | 16,46                             |
| 20   | 5,918  | 15,2825                           |
| 17,5   | 5,17825   | 14,33                             |
| <b>Control Negativo</b>  | -   | 0                                 |
| <b>Control Positivo</b><br><b>CHX</b><br><b>(30 <math>\mu</math>l)</b> | -   | 21,995                            |

F. *Sustracción de datos relevantes de los diferentes resultados obtenidos para la determinación del CMI y CMB del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada)*

| <b>EXTRACTO ETANÓLICO<br/>STREPTOCOCCUS MUTANS</b>         |   |                             |
|--|---|-----------------------------|
| <b>Volumen<br/>(<math>\mu</math>l)</b>                     | <b>Concentración<br/>(mg/<math>\mu</math>l)</b> | <b>MEDIA TOTAL<br/>(mm)</b> |
| 30   | 32,199  | 25,4625                     |
| 27,5   | 29,51575  | 22,915625                   |
| 25   | 26,8325   | 20,888125                   |
| 22,5   | 24,14925  | 19,77                       |
| 20   | 21,466  | 17,84875                    |
| 17,5   | 18,78275  | 16,648125                   |
| <b>Control Negativo</b>                                    | -   | <6                          |
| <b>Control Positivo<br/>CHX<br/>(30 <math>\mu</math>l)</b> | -   | 16,455                      |

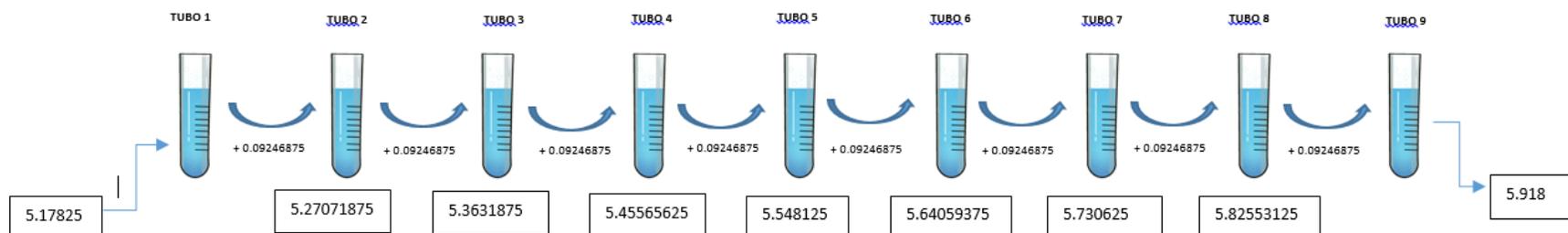
| <b>EXTRACTO ETANÓLICO<br/>PORPHYROMONAS GINGIVALIS</b>     |   |                             |
|--|---|-----------------------------|
| <b>Volumen<br/>(<math>\mu</math>l)</b>                     | <b>Concentración<br/>(mg/<math>\mu</math>l)</b> | <b>MEDIA TOTAL<br/>(mm)</b> |
| 30   | 32,199  | 21,4725                     |
| 27,5   | 29,51575  | 20,470625                   |
| 25   | 26,8325   | 18,0025                     |
| 22,5   | 24,14925  | 16,45625                    |
| 20   | 21,466  | 15,26625                    |
| 17,5   | 18,78275  | 14,5175                     |
| <b>Control Negativo</b>                                    | -   | <6                          |
| <b>Control Positivo<br/>CHX<br/>(30 <math>\mu</math>l)</b> | -   | 21,935                      |

**G. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada) para *Streptococcus mutans* ATCC 25175**



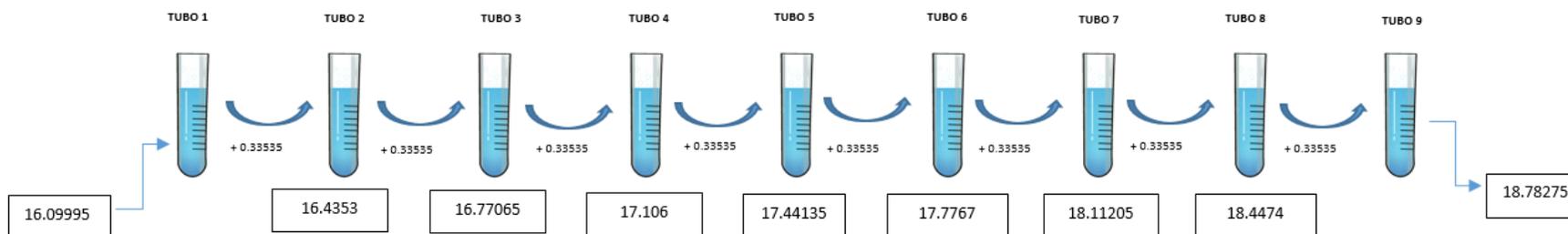
| TUBO | CONCENTRACIÓN (mg/ul) | EXTRACTO ACUOSO (vol.) | BHI (ul) | BACTERIA <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 | TOTAL (ul) |
|------|-----------------------|------------------------|----------|---|------------|
| T1   | 8,13725               | 27,5                   | 2672,5   | 300   | 3000       |
| T2   | 8,22971875            | 27,8125                | 2644,69  | 300   | 3000       |
| T3   | 8,3221875             | 28,44460227            | 2616,25  | 300   | 3000       |
| T4   | 8,41465625            | 29,4143046             | 2586,84  | 300   | 3000       |
| T5   | 8,507125              | 30,7513184             | 2556,09  | 300   | 3000       |
| T6   | 8,59959375            | 32,4985525             | 2523,6   | 300   | 3000       |
| T7   | 8,6920625             | 34,7143628             | 2488,89  | 300   | 3000       |
| T8   | 8,78453125            | 37,4757326             | 2451,42  | 300   | 3000       |
| T9   | 8,877                 | 40,8826173             | 2410,62  | 300   | 3000       |
| T +  | -                     | -                      | 2700     | 300   | 3000       |
| T -  | -                     | -                      | 3000     | -   | 3000       |

H. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de la Púnica Granatum (Granada) para Porphyromona gingivalis ATCC 33277*



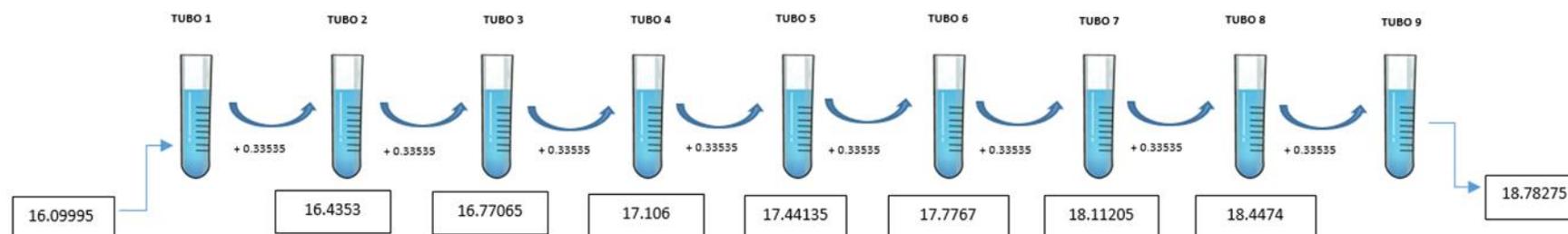
| TUBO | CONCENTRACIÓN (mg) | EXTRACTO (Vol.) | BHI (ul) | BACTERIA <i>Porphyromona gingivalis</i> ATCC 33277 | TOTAL (ul) |
|------|--------------------|-----------------|----------|--|------------|
| T1   | 5,17825            | 17,5            | 2682,5   | 300  | 3000       |
| T2   | 5,27071875         | 17,8125         | 2664,69  | 300  | 3000       |
| T3   | 5,3631875          | 18,4486607      | 2646,25  | 300  | 3000       |
| T4   | 5,45565625         | 19,4369818      | 2626,82  | 300  | 3000       |
| T5   | 5,548125           | 20,8253377      | 2,606    | 300  | 3000       |
| T6   | 5,64059375         | 22,6847429      | 2583,32  | 300  | 3000       |
| T7   | 5,730625           | 25,1152511      | 2558,21  | 300  | 3000       |
| T8   | 5,82553125         | 28,2546575      | 2529,96  | 300  | 3000       |
| T9   | 5,918              | 32,2910371      | 2497,67  | 300  | 3000       |
| T +  | -                  | -               | 2700     | 300  | 3000       |
| T -  | -                  | -               | 3000     | -  | 3000       |

I. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada) para Streptococcus mutans ATCC 25175*



| TUBO | CONCENTRACIÓN (mg) | EXTRACTO (Vol.) | BHI (ul) | BACTERIA <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 | TOTAL (ul) |
|------|--------------------|-----------------|----------|---|------------|
| T1   | 16,09995           | 15              | 2685     | 300   | 3000       |
| T2   | 16,4353            | 15,31243886     | 2669,69  | 300   | 3000       |
| T3   | 16,77065           | 15,95033231     | 2653,74  | 300   | 3000       |
| T4   | 17,106             | 16,94703304     | 2636,8   | 300   | 3000       |
| T5   | 17,44135           | 18,35900948     | 2618,45  | 300   | 3000       |
| T6   | 17,7767            | 20,27103214     | 2598,18  | 300   | 3000       |
| T7   | 18,11205           | 22,80441539     | 2575,38  | 300   | 3000       |
| T8   | 18,4474            | 26,09995        | 2549,29  | 300   | 3000       |
| T9   | 18,78275           | 30,44909058     | 2518,85  | 300   | 3000       |
| T +  | -                  | -               | 2700     | 300   | 3000       |
| T -  | -                  | -               | 3000     | -   | 3000       |

J. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de la Púnica Granatum (Granada) para Porphyromona gingivalis ATCC 33277*



| TUBO | CONCENTRACIÓN (mg) | EXTRACTO (Vol.) | BHI (ul) | BACTERIA <i>Porphyromona gingivalis</i> ATCC 33277 | TOTAL (ul) |
|------|--------------------|-----------------|----------|--|------------|
| T1   | 16,09995           | 15              | 2685     | 300  | 3000       |
| T2   | 16,4353            | 15,31243886     | 2669,69  | 300  | 3000       |
| T3   | 16,77065           | 15,95033231     | 2653,74  | 300  | 3000       |
| T4   | 17,106             | 16,94703304     | 2636,8   | 300  | 3000       |
| T5   | 17,44135           | 18,35900948     | 2618,45  | 300  | 3000       |
| T6   | 17,7767            | 20,27103214     | 2598,18  | 300  | 3000       |
| T7   | 18,11205           | 22,80441539     | 2575,38  | 300  | 3000       |
| T8   | 18,4474            | 26,09995        | 2549,29  | 300  | 3000       |
| T9   | 18,78275           | 30,44909058     | 2518,85  | 300  | 3000       |
| T +  | -                  | -               | 2700     | 300  | 3000       |
| T -  | -                  | -               | 3000     | -  | 3000       |

K. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto acuoso y etanólico de la Púnica Granatum sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 y Porphyromona gingivalis ATCC 33277*

| EXTRACTO  |     | CEPA BACTERIANA                        |   |
|-----------|-----|--|---|
|           |     | <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 | <i>Porphyromona gingivalis</i> ATCC 33277 |
| ACUOSO    | CMI | 8,6920625                              | 5,45565625                                |
|           | CMB | 8,877                                  | 5,64059                                   |
| ETANÓLICO | CMI | 16,77065                               | 17,7767                                   |
|           | CMB | 17,44135                               | 18,4474                                   |

Anexo 8. Galería fotográfica

**PROCESAMIENTO DE LA GRANADA**



**Figura 5 y Figura 6. Selección de la fruta.**



**Figura 7 y Figura 8. Descascaramiento y lavado.**



**Figura 9 y Figura 10. Ecurrimento de la cáscara y esparcimiento en estufa.**



**Figura 11.** Dsecación de la cáscara en estufa a 50°C por 48 horas.



**Figura 12 y Figura 13.** Pulverización de la cáscara con ayuda de un molinillo eléctrico.



**Figura 14 y Figura 15.** Tamización del polvo de la cáscara.



**Figura 16.** Obtención de polvo fino de la cáscara de la Granada.



**Figura 17 y Figura 18.** Almacenamiento y conservación del polvo fino.

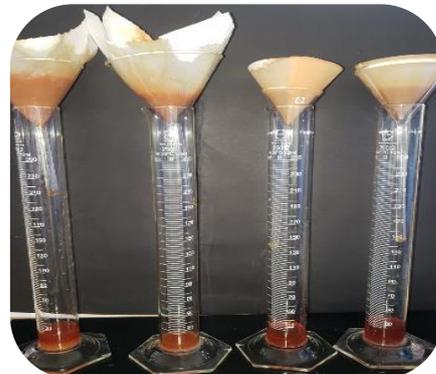
### **PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO**



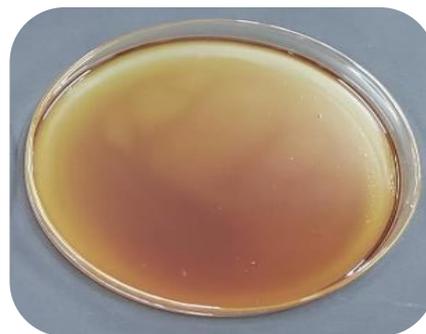
**Figura 19 y Figura 20.** Pesaje y preparación del polvo fino con agua destilada.



**Figura 21.** Conservación de la preparación para su maceración.



**Figura 22 y Figura 23.** Proceso de filtración con papel Whatman.



**Figura 24, Figura 25.** Obtención del extracto seco.



**Figura 26 y Figura 27.** Pesaje y conservación del extracto seco.



**Figura 28 y Figura 29.** Preparación de la sustancia del extracto acuoso de la Granada.

### **PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO**



**Figura 30, Figura 31 y Figura 32.** Preparación del polvo fino con alcohol 70° para su maceración en una damajuana.



**Figura 33.** Proceso de filtración.



**Figura 34, Figura 35 y Figura 36.** Principio activo en placa Petri llevada a estufa a una temperatura de 50°C para obtención de extracto seco.



**Figura 37 y Figura 38.** Extracción del extracto seco mediante raspado y envuelto para su conservación.

**PRUEBA DE SENSIBILIDAD DEL EXTRACTO ACUOSO FRENTE A  
CEPAS *PORPHYROMONA GINGIVALIS* Y *STREPTOCOCCUS MUTANS***



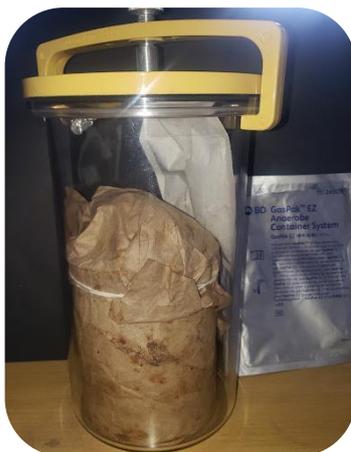
**Figura 39 y Figura 40.** Preparación y dilución de la sustancia en vibrador eléctrico.



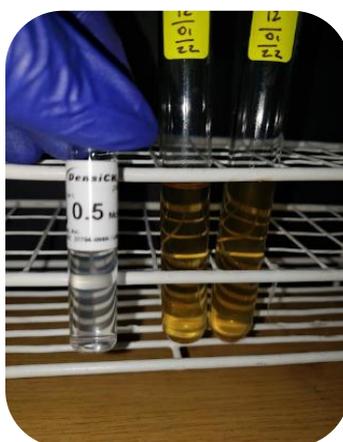
**Figura 41, Figura 42 y Figura 43.** Activación de las cepas *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* mediante cultivo de las bacterias en caldo BHI introducidas en Jarra de anaerobiosis con sobre Gas-Pak llevadas a la incubadora por 24 horas a 34°C.



**Figura 44, Figura 45, Figura 46, Figura 47 y Figura 48.** Sembrado en estría de las cepas *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* en viales.



**Figura 49.** Viales colocados en jarra de anaerobiosis con sobre Gas-Pack.



**Figura 50.** Comparación de la turbidez de la muestra con la escala de McFarland.



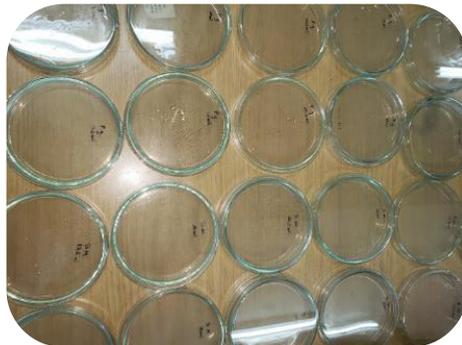
**Figura 51, Figura 52, Figura 53 y Figura 54.** Proceso de preparación de Agar Mueller Hinton mediante dilución por calor.



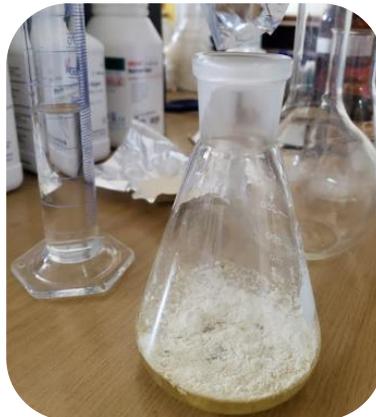
**Figura 55.** Agar Mueller Hinton llevada a la autoclave vertical para su esterilización.



**Figura 56, Figura 57 y Figura 58.** Mueller Hinton de sólido a líquido mediante el uso de calor.



**Figura 59.** Placas Petri vertidas con Mueller Hinton.



**Figura 60.** Preparación de Agar Nutritivo.



**Figura 61.** Agar nutritivo en viales.



**Figura 62.** BHI vertidas en tubos de ensayos.



**Figura 63.** Inoculación de la bacteria *Streptococcus mutans* y *Porphyromona gingivalis*.



**Figura 64, Figura 65 y Figura 66.** Siembra de las bacterias *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* en tubos de ensayo para su incubación.



**Figura 67.** Placas Petri con Mueller Hinton gelificados por calor.



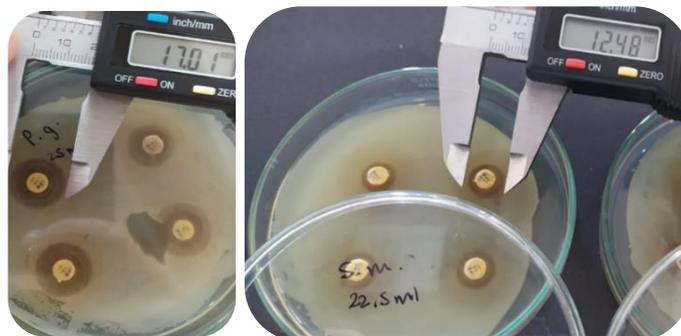
**Figura 68.** Placas Petri rotuladas con nombre de bacteria y volumen.



**Figura 69 y Figura 70.** Distribución del extracto en volúmenes sobre los discos de sensibilidad.



**Figura 71, Figura 72, Figura 73, Figura 74 y Figura 75.** Sembrado de bacteria, distribución de discos en placas Petri, Placas Petri en jarra de anaerobiosis e incubación.

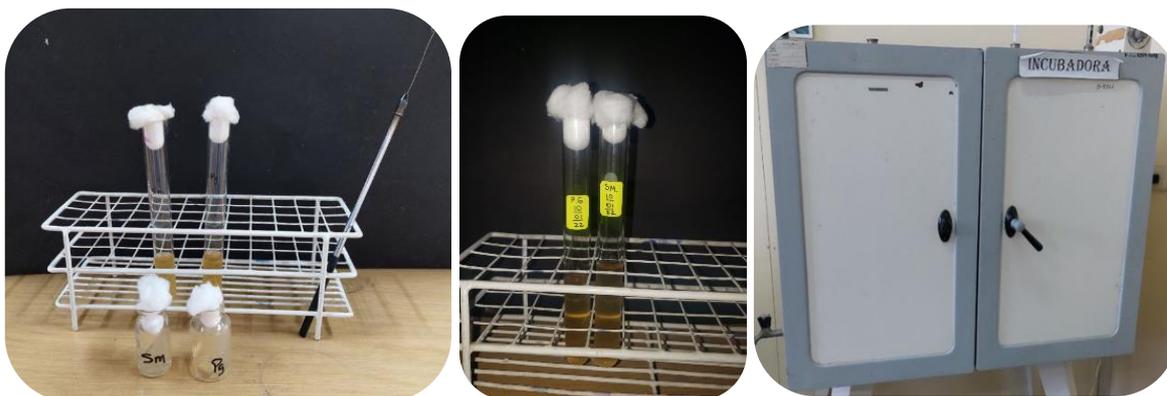


**Figura 76 y Figura 77.** Medición de los halos de inhibición con una regla de vernier digital.

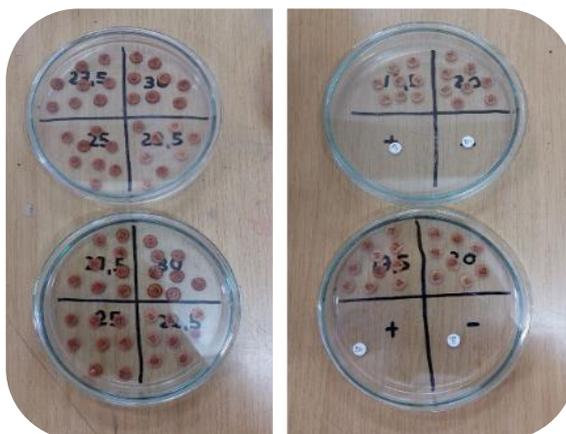
**PRUEBA DE SENSIBILIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO FRENTE  
A CEPAS PORPHYROMONAS GINGIVALIS Y STREPTOCOCCUS  
MUTANS**



**Figura 78 y Figura 79.** Inoculación de la bacteria *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* en viales.



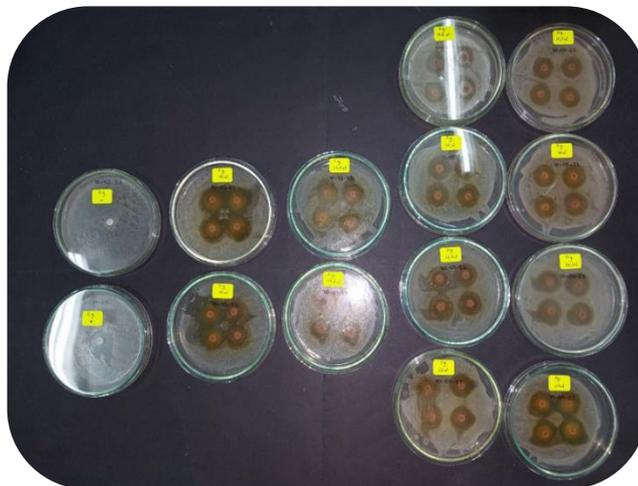
**Figura 80, Figura 81 y Figura 82.** Siembra de las cepas *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* en tubos de ensayo con caldo BHI e incubación.



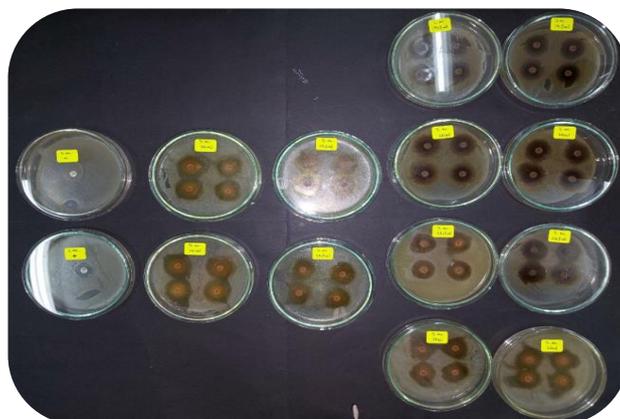
**Figura 83.** Discos de sensibilidad untados en extracto etanólico según volumen.



**Figura 84.** Incubación de jarra de anaerobiosis con Placas Petri e incubada por 24 horas.



**Figura 85.** Medición de los halos de inhibición del extracto etanólico frente a *Porphyromonas gingivalis*.

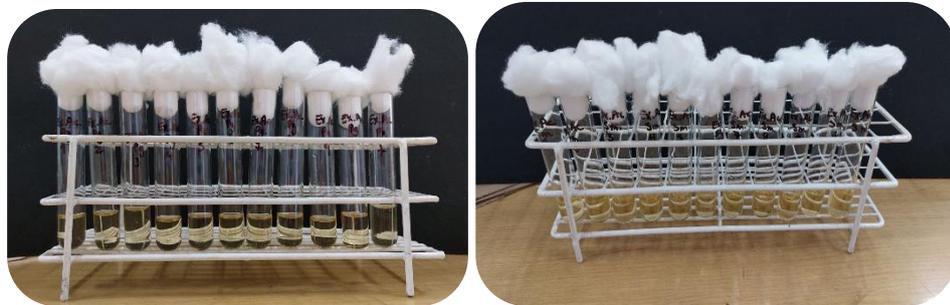


**Figura 86.** Medición de los halos de inhibición del extracto etanólico frente a *Streptococcus mutans*.

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA  
INHIBITORIA (CMI)**



**Figura 87 y Figura 88.** Activación de las cepas bacterianas y preparación del caldo BHI.



**Figura 89 y Figura 90.** Tubos de ensayo con extracto acuoso en distintos volúmenes, bacteria (*Streptococcus mutans* / *Porphyromonas gingivalis*) y caldo BHI.

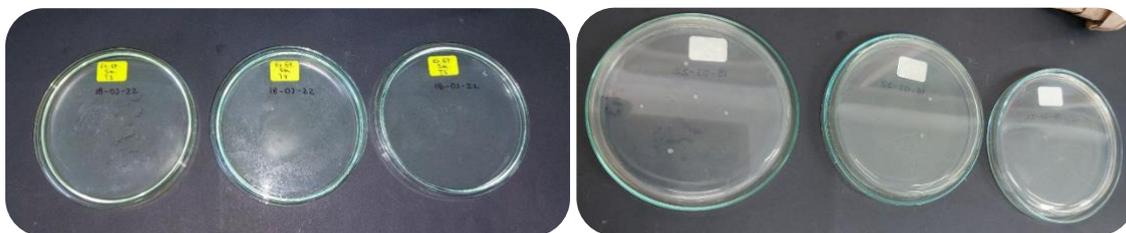


**Figura 91 y Figura 92.** Tubos de ensayo con extracto etanólico en distintos volúmenes, bacteria (*Streptococcus mutans* / *Porphyromonas gingivalis*) y caldo BHI.

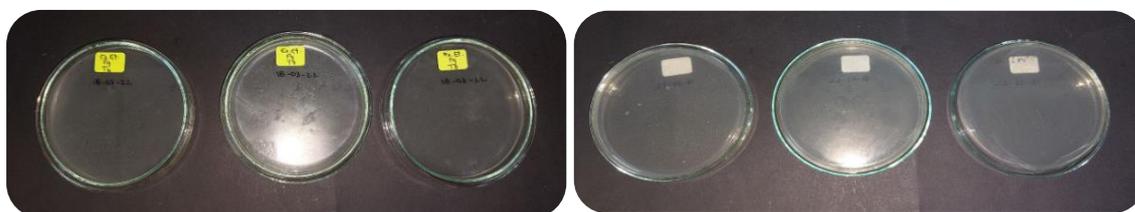


**Figura 93.** Tubos de ensayo después de incubación por 24 horas a 34°C. Según su turbidez se detectó los tubos que se usaran para determinación de CMB sembradas en placas Petri.

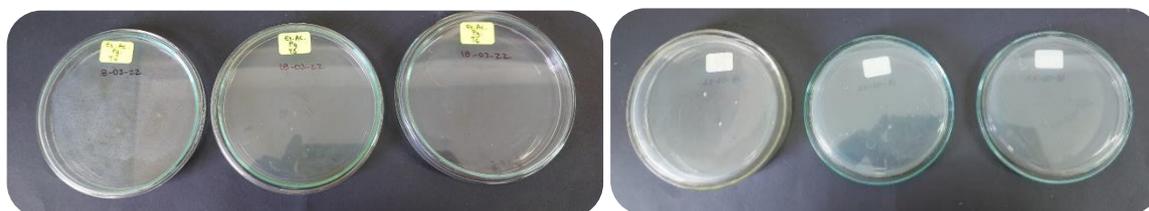
**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÁXIMA**  
**BACTERICIDA (CMB)**



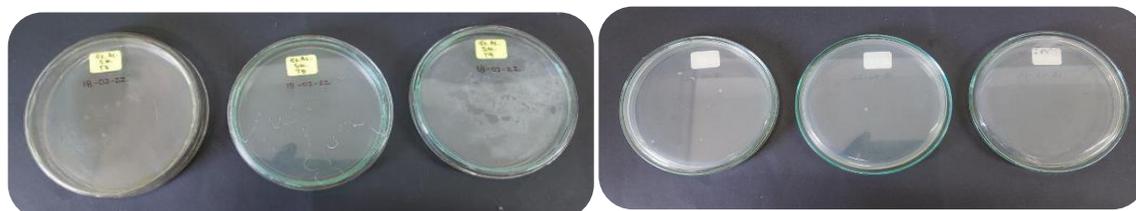
**Figura 94 y Figura 95.** Lectura del CMB del Extracto etanólico frente a *Streptococcus mutans*.



**Figura 96 y Figura 97.** Lectura del CMB del extracto etanólico frente a la *Porphyromonas gingivalis*.



**Figura 98 y Figura 99.** Lectura del CMB del Extracto acuoso frente a *Streptococcus mutans*.



**Figura 100 y Figura 101.** Lectura del CMB del extracto acuoso frente a la *Porphyromonas gingivalis*.