

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



TESIS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA IN VITRO DE UN COLUTORIO ELABORADO CON EXTRACTO ALCOHÓLICO DE CHILI CHILI (*Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff.*) y SACHA PARACCAY (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) sobre cepas de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*

PRESENTADO POR:

Br. DANIA EDITH MAMANI COAQUIRA

Br. CLAUDIA VERONICA SANTANDER RAMIREZ

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

ASESORA:

Dra. ANAHÍ KARINA CARDONA RIVERO

CUSCO – PERÚ

2025



Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco

INFORME DE SIMILITUD

(Aprobado por Resolución Nro. CU-321-2025-UNSAAC)

El que suscribe, el Asesor Anahí Karina Cardena Rivera.....
..... quien aplica el software de detección de similitud al
trabajo de investigación/tesis titulada: Evaluación de la actividad antibacteriana y.....
antifúngica in vitro de un colutorio elaborado con extracto alcohólico de Chile chilé
(Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.) y Sacha paracoy (Coligomeria parujleria (Kunth)
Choisy) sobre cepas de Candida albicans y Streptococcus mutans.....

Presentado por: Dania Edith Mamani Coaguira..... DNI N° 76181108.....;

presentado por: Claudia Verónica Santander Ramírez..... DNI N°: 75743459.....

Para optar el título Profesional/Grado Académico de
..... Química Farmacéutica.....

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 02 veces, mediante el
Software de Similitud, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso del Sistema Detección de
Similitud en la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 10%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No sobrepasa el porcentaje aceptado de similitud.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las subsanaciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, conforme al reglamento, quien a su vez eleva el informe al Vicerrectorado de Investigación para que tome las acciones correspondientes; Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de Asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto las primeras páginas del reporte del Sistema de Detección de Similitud.

Cusco, 21 de mayo de 2026

Firma

Post firma Anahí Karina Cardena Rivera

Nro. de DNI 23998511

ORCID del Asesor 0000-0001-6397-9162

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema de Detección de Similitud: oid: 272590593620371

TESIS FINAL 14.05.26 .pdf

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::27259:593620371

154 páginas

Fecha de entrega

21 may 2026, 5:46 p.m. GMT-5

32.947 palabras

Fecha de descarga

21 may 2026, 6:58 p.m. GMT-5

199.065 caracteres

Nombre del archivo

TESIS FINAL 14.05.26 .pdf

Tamaño del archivo

4.8 MB

10% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Exclusiones

- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 5%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

En primer lugar este logro va dedicado a DIOS por guiarme a lo largo de mi carrera así como también a mis padres que son lo más importante para mí, me han brindado todo su apoyo y son mi ejemplo a seguir para lograr mis objetivos. A mis hermanas por siempre alentarme y confiar en mí.

Dania Edith Mamani Coaquira

A MIS PADRES

Quienes me forjaron con principios y valores para la construcción de mi vida profesional. Por sus sacrificios, esfuerzos, paciencia, consejos, por siempre estar ahí para apoyarme e impulsarme a estudiar para ser una gran profesional.

Claudia Veronica Santander Ramirez

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por brindarnos protección, salud, vida cada día y darnos las fuerzas para poder seguir adelante a pesar de las dificultades.

A nuestra asesora Dra. Anahí Karina Cardona Rivero por su apoyo incondicional, por su tiempo, por sus consejos y orientación en este proceso para la realización de la tesis.

A todos los docentes de la Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por brindarnos todos sus conocimientos y experiencias a lo largo de nuestra formación personal y profesional.

A nuestra Co-Asesora Mgt. Zany Sigrid Frisancho Triveño por su ayuda, orientación y colaboración para superar las diferentes dificultades que se presentaron a lo largo de la elaboración de este trabajo de investigación.

Dania y Claudia

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN.....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
GENERALIDADES	1
1.1. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.3. OBJETIVOS	2
1.3.1. OBJETIVO GENERAL	2
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
1.4. JUSTIFICACIÓN	3
1.5. HIPÓTESIS	3
CAPÍTULO II.....	1
MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL	1
2.1. VISIÓN HISTÓRICA.....	1
2.2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....	2
2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES	2
2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES.....	4
2.2.3. ANTECEDENTES LOCALES	6
2.3. ESTADO DEL ARTE	9
2.4. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	11
2.4.1. PLANTA EN ESTUDIO: <i>Geranium ruizii</i> Hieron. vel. sp. aff. (Chili chili)11	
2.4.2. PLANTA EN ESTUDIO: <i>Colignonia parviflora</i> (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)	13
2.4.3. METABOLITOS SECUNDARIOS ASOCIADOS CON LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA	15
2.4.4. BACTERIA EN ESTUDIO: <i>Streptococcus mutans</i>	17
2.4.5. HONGO EN ESTUDIO: <i>Candida albicans</i>	18
2.4.6. CEPAS ATCC.....	20
2.4.7. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA	20
2.4.8. MÉTODO DE DILUCIÓN	21

2.4.10. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR	23
2.4.11. COLUTORIO.....	24
2.4.12. MEDICAMENTOS CONVENCIONALES UTILIZADOS COMO REFERENCIA TERAPÉUTICA EN MUCOSITIS ORAL	26
2.4.13. PRUEBA DE IRRITACIÓN.....	28
2.5. MARCO CONCEPTUAL.....	30
CAPÍTULO III.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	32
3.1.1. MATERIAL VEGETAL.....	32
3.1.2. MATERIAL MICROBIANO	32
3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	32
3.2.1. MEDIOS DE CULTIVO	32
3.2.2. MATERIALES DE VIDRIO Y METAL.....	32
3.2.3. INSTRUMENTOS DE PRECISIÓN Y AUXILIARES	33
3.2.4. EQUIPOS DE LABORATORIO.....	33
3.2.5. INSUMOS	33
3.3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	34
3.3.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	34
3.3.2. DISEÑO DE PRUEBA ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO	34
3.3.3. DISEÑO DE PRUEBA ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DEL COLUTORIO ELABORADO	36
3.4. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	38
3.4.1. VARIABLES IMPLICADAS	38
3.4.2. VARIABLES NO IMPLICADAS	43
VARIABLES INTERVINIENTES	43
3.4.3. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	45
3.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	49
3.5.1. DE LA MUESTRA VEGETAL.....	49
3.5.2. DE LAS CEPAS MICROBIANAS	49
3.5.3. DE LOS HUEVOS EMBRIONADOS PARA LA PRUEBA HET-CAM	50
3.6. PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	50
3.6.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE CHILI CHILI (<i>G. ruizii</i>) Y SACHA PARACCAY (<i>C. parviflora</i>)	50
3.6.2. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	53

3.6.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO.....	53
3.6.4. PROCEDIMIENTO GENERAL DEL ESTUDIO.....	54
3.6.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>G. ruizii</i> (Chili chili) Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay).....	55
3.6.6. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO	60
3.6.7. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE LOS COLUTORIO ELABORADOS.....	63
3.6.8. PRUEBA DE IRRITACIÓN POR EL MÉTODO HET-CAM.....	64
3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	65
3.7.1. TÉCNICA	65
3.7.2. INSTRUMENTOS	65
3.8. TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN	65
CAPÍTULO IV	66
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	66
4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE CHILI CHILI (<i>Geranium ruizii</i> Hieron. vel sp. aff.) y SACHA PARACCAY (<i>Colignonia parviflora</i> (Kunth) Choisy).....	66
4.1.1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD	66
4.1.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO.....	67
4.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS: MARCHA FITOQUÍMICA.....	68
4.2.1. ENSAYOS PRELIMINARES	71
4.2.2. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS.....	73
4.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL CHILI CHILI (<i>G. ruizii</i>)	74
4.3.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DEL CHILI CHILI (<i>G. ruizii</i>) FRENTE A CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	74
4.3.2. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>G. ruizii</i> (Chili chili) FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	76
4.3.3. PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>G. ruizii</i> (Chili chili) FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	79
4.4. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay).....	82
4.4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y FUNGICIDA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) FRENTE A CEPAS <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	82

4.4.2. SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) FRENTE A <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	84
4.4.3. PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) FRENTE A <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	86
4.5. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO CON EL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	88
4.6. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS.....	89
4.6.1. HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS DE LOS DEL EXTRACTOS ALCOHÓLICOS <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	89
4.6.2. HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS DE LOS EXTRACTO ALCOHOLICOS DE <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) FRENTE A <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	94
4.7. CARACTERÍSTICAS DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS A BASE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE <i>G. ruizii</i> y <i>C. parviflora</i>	98
4.7.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS A BASE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	98
4.7.2. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS COLUTORIOS ELABORADO A BASE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	99
4.8. PRUEBA DE IRRITABILIDAD POR EL MÉTODO HET – CAM	100
CONCLUSIONES.....	102
BIBLIOGRAFÍA.....	106
ANEXO.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulación patrón del colutorio.	25
Tabla 2. Clasificación para determinar la irritabilidad mediante método HET-CAM .	29
Tabla 3. Actividad antibacteriana del extracto alcohólico de Chili Chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>) frente a <i>Streptococcus mutans</i>	34
Tabla 4. Actividad antifúngica del extracto alcohólico de Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>) frente a <i>Candida albicans</i>	35
Tabla 5. Actividad antibacteriana de colutorio elaborado a base del extracto alcohólico de Chili chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>) y Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>) frente a <i>Streptococcus mutans</i>	36
Tabla 6. Actividad antifúngica del colutorio elaborado a base del extracto alcohólico de Chili chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>) y Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>) frente a <i>Candida albicans</i>	37
Tabla 7. Operacionalización de variables	45
Tabla 8. Operacionalización de variable no intervinientes.....	48
Tabla 9. Análisis fitoquímico cualitativo	53
Tabla 10. Concentraciones preliminares para sensibilidad antimicrobiana	56
Tabla 11. Fórmula unitaria colutorio A: Colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili).....	60
Tabla 12. Fórmula unitaria colutorio B: colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	60
Tabla 13. Fórmula unitaria colutorio C: colutorio elaborado con 50% del extracto alcohólico de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y 50% del extracto alcohólico de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay).....	61
Tabla 14. Porcentaje de humedad de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay).....	66
Tabla 15. Porcentaje de rendimiento de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay).....	67
Tabla 16. Análisis fitoquímico cualitativo del extracto de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) al 70%.....	69
Tabla 17. Prueba de solubilidad de los extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	71
Tabla 18. Control microbiológico de los extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	73
Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico al 70% del Chili chili (<i>G. ruizii</i>) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	74
Tabla 20. Halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	76
Tabla 21. Prueba de normalidad y homogeneidad	79
Tabla 22. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de <i>G. filipes</i> (Chili chili).....	80

Tabla 23. Prueba Post-Hoc De Dunn para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	80
Tabla 24. Concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico al 70% del <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	82
Tabla 25. Halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	84
Tabla 26. Prueba de normalidad y homogeneidad	86
Tabla 27. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	86
Tabla 28. Prueba Post-Hoc de Dunn para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	87
Tabla 29. Formulación unitaria de los colutorios a base de extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay).....	88
Tabla 30. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	89
Tabla 31. Prueba de normalidad y homogeneidad	91
Tabla 32. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	92
Tabla 33. Prueba Post-Hoc de Dunn para halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	92
Tabla 34. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	94
Tabla 35. Prueba de normalidad y homogeneidad	96
Tabla 36. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	96
Tabla 37. Prueba Post-Hoc de Dunn para halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	97
Tabla 38. Características organolépticas y fisicoquímicas de los colutorios elaborados a base de los extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> y <i>C. parviflora</i>	98
Tabla 39. Control microbiológico de los colutorios elaborados a base de los extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	99
Tabla 40. Pruebas de irritabilidad de los colutorios elaborados con los extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) por el método HET-CAM	100

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Halos de inhibición del extracto alcohólico de Chili chili (<i>G. ruizii</i>) frente a tratamientos de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	78
Gráfico 2. Halos de inhibición del extracto alcohólico de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a tratamientos de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	85
Gráfico 3. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	90
Gráfico 4. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los extractos alcohólicos de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	95

ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

Flujograma 1. Obtención del extracto alcohólico de Chili chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>) y Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>)	52
Flujograma 2. Procedimiento general del estudio.....	54
Flujograma 3. Actividad antibacteriana del extracto alcohólico de Chili chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>)	58
Flujograma 4. Actividad antifúngica del extracto alcohólico del Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>)	59
Flujograma 5. Formulación y elaboración del colutorio	62
Flujograma 6. Prueba de sensibilidad de los colutorios elaborados	63
Flujograma 7. Prueba de irritación método HET – CAM (Membrana corioalantoidea)	64

ABREVIATURAS

ATCC	: American type culture collection/Colección de cultura tipo americana
ANOVA	: Análisis de varianza
cm	: Centímetro
°C	: Grados centígrados
g	: Gramos
L	: Litro
mg	: Miligramo
mL	: Mililitros
mm	: Milímetro
m.s.n.m.	: Metros sobre el nivel del mar
µg	: Microgramo
µL	: Microlitro

RESUMEN

Objetivo: Evaluar in vitro la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* y antifúngica frente a *Candida albicans* de colutorios elaborados con extractos alcohólicos de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay).

Metodología: Se realizó un estudio experimental con diseño cuasi experimental. Los extractos alcohólicos se obtuvieron mediante maceración, filtración y evaporación, evaluándose su humedad, rendimiento y composición fitoquímica. La actividad antimicrobiana se determinó mediante concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y fungicida utilizando el método de microdilución. Posteriormente, se formularon colutorios y se evaluó su eficacia mediante difusión en agar por el método Kirby-Bauer, midiendo los halos de inhibición con vernier y comparándolos con colutorios comerciales. Además, se realizaron controles organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos, así como la evaluación de irritabilidad oral mediante el método HET-CAM.

Resultados: El análisis fitoquímico evidenció fenoles, flavonoides, taninos y glicósidos, compuestos relacionados con actividad antimicrobiana. El extracto de *G. ruizii* presentó una CMI de 14 µg/ml y CMB de 16 µg/ml frente a *S. mutans*, mientras que *C. parviflora* mostró una CMI de 16 µg/ml y concentración fungicida de 32 µg/ml frente a *C. albicans*. Los colutorios elaborados presentaron halos de inhibición de hasta 20.6 mm, cercanos a los obtenidos por colutorios comerciales.

Conclusión: Los colutorios elaborados con *G. ruizii* y *C. parviflora* demostraron actividad antibacteriana y antifúngica in vitro, sin evidenciar efectos irritantes sobre la mucosa oral.

Palabras clave: *G. ruizii* (Chili Chili), *C. parviflora* (Sacha paraccay), *Candida albicans* ATCC 1023, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Colutorios.

ABSTRACT

Objective: To evaluate in vitro the antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antifungal activity against *Candida albicans* of mouthwashes formulated with alcoholic extracts of *G. ruizii* (Chili chili) and *C. parviflora* (Sacha paraccay).

Methodology: An experimental study with a quasi-experimental design was conducted. Alcoholic extracts were obtained through maceration, filtration, and evaporation, and their moisture content, yield, and phytochemical composition were evaluated. Antimicrobial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and fungicidal concentration using the microdilution method. Subsequently, mouthwashes were formulated and their efficacy was assessed by agar diffusion using the Kirby–Bauer method, measuring inhibition zones with a vernier caliper and comparing them with commercial mouthwashes. In addition, organoleptic, physicochemical, and microbiological controls were performed, as well as oral irritability assessment using the HET-CAM method.

Results: Phytochemical analysis revealed the presence of phenols, flavonoids, tannins, and glycosides, compounds associated with antimicrobial activity. The *G. ruizii* extract showed an MIC of 14 µg/mL and an MBC of 16 µg/mL against *S. mutans*, while *C. parviflora* exhibited an MIC of 16 µg/mL and a fungicidal concentration of 32 µg/mL against *C. albicans*. The formulated mouthwashes produced inhibition zones of up to 20.6 mm, comparable to those obtained with commercial mouthwashes.

Conclusion: Mouthwashes formulated with *G. ruizii* and *C. parviflora* demonstrated in vitro antibacterial and antifungal activity without showing irritant effects on the oral mucosa.

Keywords: *G. ruizii* (Chili chili), *C. parviflora* (Sacha paraccay), *Candida albicans* ATCC 10231, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Mouthwashes.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos, el ser humano ha mantenido una estrecha relación con los recursos naturales, particularmente con las plantas, las cuales han desempeñado un papel fundamental en la alimentación, la construcción y, de manera destacada, en la prevención y tratamiento de enfermedades. A nivel mundial, se han registrado aproximadamente 50 000 especies vegetales con propiedades medicinales, lo que representa cerca del 10 % de las especies botánicas conocidas. A pesar del avance de la medicina moderna y la síntesis de principios activos en fármacos estandarizados, en las últimas décadas ha surgido un renovado interés por el uso de productos naturales debido a las preocupaciones relacionadas con los efectos secundarios, la resistencia microbiana y la eficacia a largo plazo de algunos medicamentos sintéticos (1).

En el ámbito de la salud oral, las infecciones bacterianas y fúngicas continúan representando un problema relevante, especialmente en poblaciones inmunocomprometidas. Entre estas, la mucositis oral es una de las complicaciones más frecuentes en pacientes sometidos a tratamientos oncológicos como la quimioterapia y la radioterapia, afectando significativamente su calidad de vida y aumentando el riesgo de infecciones oportunistas (2).

Frente a esta problemática, los fitofármacos han surgido como una alternativa terapéutica prometedora, debido a su origen natural, su menor incidencia de efectos adversos y su potencial actividad antimicrobiana. En este contexto, diversas especies vegetales utilizadas tradicionalmente en la región del Cusco, como *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)*, han despertado interés científico por sus posibles propiedades antibacterianas y antifúngicas, aunque su aplicación en formulaciones farmacéuticas aún requiere validación experimental.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La mucositis oral constituye una de las complicaciones más frecuentes y debilitantes en pacientes oncológicos sometidos a quimioterapia y/o radioterapia, con una incidencia que puede alcanzar hasta el 90 % en determinados grupos poblacionales. Esta condición inflamatoria se manifiesta clínicamente con dolor intenso, ulceraciones, xerostomía y dificultad para la alimentación y el habla, lo que incrementa el riesgo de infecciones secundarias y puede obligar a la interrupción o modificación del tratamiento oncológico (3) (4).

Diversos estudios reportan que un alto porcentaje de pacientes con mucositis desarrolla infecciones oportunistas causadas principalmente por *Candida albicans* y bacterias del género *Streptococcus*, microorganismos que agravan el cuadro clínico y aumentan la morbilidad (5). A pesar de su alta prevalencia e impacto clínico, actualmente no existe un tratamiento específico y curativo aprobado para la mucositis oral, limitándose su manejo a medidas sintomáticas y preventivas (6).

En la región del Cusco, especies vegetales como *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)* son empleadas tradicionalmente por sus propiedades medicinales; sin embargo, existe una limitada evidencia científica que respalde su eficacia antimicrobiana en formulaciones farmacéuticas destinadas al uso oral. Esta falta de validación constituye un vacío de conocimiento que restringe su incorporación como alternativas terapéuticas en el manejo de la mucositis oral en pacientes oncológicos.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará actividad antibacteriana in vitro sobre cepas de *Streptococcus mutans* y antifúngica sobre cepas de *Candida albicans* el colutorio elaborado con extracto alcohólico de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)*?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana in vitro sobre cepas de *Streptococcus mutans* y actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans* de un colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)*.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el extracto alcohólico al 70% de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)* mediante el método de la maceración.
2. Evaluar la composición fitoquímica cualitativa de metabolitos secundarios (alcaloides, azúcares reductores, saponinas, flavonoides, quinonas, taninos y aminoácidos) de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)* mediante ensayos fitoquímicos.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria y bactericida del extracto alcohólico de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* a la cepa de *Streptococcus mutans* mediante el método de microdilución.
4. Determinar la concentración mínima fungistática y fungicida del extracto alcohólico de y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)* frente a la cepa de *Candida albicans* mediante el método de microdilución.
5. Formular y elaborar una forma farmacéutica líquida de aplicación tópica oral (colutorio) a base de extractos alcohólicos de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)*.
6. Determinar la sensibilidad bacteriana y fúngica de las cepas de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* frente al colutorio elaborado con extractos de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)* mediante discos de prueba de sensibilidad antimicrobiana.
7. Evaluar las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas de los colutorios elaborados con extractos de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)*.
8. Evaluar la irritabilidad de los colutorios elaborados mediante el método in vitro HET – CAM.

1.4. JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se justifica por la necesidad de identificar alternativas terapéuticas seguras, eficaces y accesibles para el manejo de infecciones asociadas a la mucositis oral en pacientes oncológicos. Dado que los tratamientos convencionales disponibles son mayormente paliativos y pueden generar efectos adversos o resistencia microbiana, resulta prioritario explorar nuevas opciones basadas en productos naturales (7).

Desde el punto de vista:

- **Científica:** Busca generar evidencia sobre la actividad antimicrobiana de extractos vegetales locales frente a cepas clínicas de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* los cuales son agentes frecuentemente implicados en infecciones asociadas a mucositis. Este conocimiento puede contribuir al desarrollo de nuevos fitofármacos (7).
- **Social y sanitaria:** Apunta a la mejora de la calidad de vida de pacientes oncológicos mediante el uso de colutorios elaborados con productos naturales, seguros y de fácil acceso especialmente para poblaciones con bajos recursos económicos (8).
- **Ecológica y cultural:** Promueve el aprovechamiento racional y sostenible de plantas medicinales autóctonas del Cusco revalorizando el conocimiento ancestral e integrándolo a la investigación científica moderna (8).

En suma, esta investigación no solo responde a una necesidad clínica real sino también abre el camino hacia el desarrollo de fitopreparados que puedan incorporarse como coadyuvantes en el tratamiento de la mucositis oral fortaleciendo la integración entre la medicina tradicional y la ciencia.

1.5. HIPÓTESIS

Los colutorios elaborados a base de extractos alcohólicos de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)* presentan actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro*, evidenciada por la formación de halos de inhibición y valores de concentración mínima inhibitoria, frente a cepas de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, respectivamente.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1. VISIÓN HISTÓRICA

Desde los orígenes de la humanidad, las plantas medicinales han sido empleadas como una de las principales herramientas terapéuticas para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Evidencias arqueológicas y registros históricos demuestran su uso desde hace más de 5 000 años, destacando obras clásicas como *De Materia Medica* de Dioscórides, considerado el padre de la Farmacognosia, donde se documenta el empleo de especies vegetales con propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias. Este conocimiento ancestral sentó las bases de la fitoterapia, disciplina que estudia el uso medicinal de productos de origen vegetal (9).

Con el desarrollo de la microbiología en los siglos XIX y XX, se estableció la relación entre microorganismos y enfermedades infecciosas, permitiendo identificar agentes patógenos relevantes de la cavidad oral. Entre ellos, *Streptococcus mutans* fue reconocido por su papel en la formación de biopelículas y en la génesis de procesos infecciosos dentales, mientras que *Candida albicans* fue identificada como un hongo oportunista capaz de proliferar en la mucosa oral, especialmente en condiciones de desequilibrio de la microbiota o inmunosupresión (10).

Paralelamente, los colutorios surgieron como preparados destinados a la higiene y desinfección de la cavidad oral. Desde su aparición en el siglo XIX, estos productos han evolucionado hasta convertirse en una herramienta complementaria en la prevención y control de infecciones orales, siendo ampliamente utilizados para reducir la carga microbiana. No obstante, el uso prolongado de colutorios comerciales con agentes químicos ha sido asociado a efectos adversos, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas basadas en compuestos naturales (11).

En diversas regiones del mundo, y particularmente en el Perú, la biodiversidad vegetal ha permitido el uso tradicional de plantas con propiedades medicinales aplicadas a la

salud oral. En la región del Cusco, especies como *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)* han sido utilizadas ancestralmente para el tratamiento de procesos inflamatorios e infecciosos. Sin embargo, a pesar de su uso tradicional, existe limitada evidencia científica que respalde su actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* y antifúngica frente a *Candida albicans* en formulaciones farmacéuticas como colutorios. (12)

En este contexto histórico, surge la necesidad de evaluar científicamente la actividad antimicrobiana de colutorios elaborados con extractos alcohólicos de *Geranium ruizii Hieron. vel sp.aff. (Chili chili)* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)*, como una alternativa natural y potencialmente eficaz para el control de microorganismos orales, contribuyendo al desarrollo de fitopreparados aplicables a la salud bucal.

2.2. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.2.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- **Ghandehari, K. Et all. (2025). Actividad antimicrobiana de extractos herbales frente a *Streptococcus mutans*. Universidad de Ciencias Médicas de Mashhad. Irán.**

Objetivo: Evaluar la efectividad antimicrobiana de extractos herbales acuosos y alcohólicos frente a *Streptococcus mutans*, comparándolos con agentes antimicrobianos convencionales empleados en la higiene oral. (13)

Metodología: Se realizó una revisión sistemática y metaanálisis de ensayos clínicos controlados publicados hasta el año 2023. Se analizaron estudios que evaluaron la reducción de *Streptococcus mutans* mediante el uso de extractos vegetales en colutorios y otras formulaciones orales. (13)

Resultados: Los extractos herbales mostraron una reducción significativa de *Streptococcus mutans* en comparación con placebos y colutorios no herbales. No se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas frente a la clorhexidina. (13)

Conclusión: Los extractos herbales representan una alternativa prometedora para el control de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral; sin embargo, se recomienda continuar con estudios clínicos controlados. (13)

- **Kan, Y. Lee, J. Kim, H. Et all. (2023). Actividad antimicrobiana combinada de extractos vegetales en colutorios herbales. Universidad de Medicina Tradicional Coreana. Corea del Sur.**

Objetivo: Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos vegetales combinados y su aplicación en un colutorio herbal frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. (14)

Metodología: Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de *Quercus infectoria* y *Scrophularia striata*, los cuales fueron evaluados mediante los métodos de microdilución y difusión en agar. Posteriormente, se formuló un colutorio herbal y se evaluó su estabilidad y actividad antimicrobiana in vitro. (14)

Resultados: La combinación de extractos mostró mayor actividad antimicrobiana que los extractos individuales, con inhibición significativa frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. (14)

Conclusión: Los colutorios herbales formulados con extractos vegetales combinados constituyen una alternativa eficaz y segura para el control de microorganismos orales. (14)

- **Pombo, Luis. Et all. (2015). Capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de *Pelargonium odoratissimum* frente a diferentes tipos de cepas. Fundación Universitaria Juan N. Corpas. Bogotá. Colombia.**

Objetivo: Evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes extractos y fracciones de *Pelargonium odoratissimum* frente a un grupo específico de patógenos, así como determinar su capacidad antioxidante (15).

Metodología: Se realizó una extracción continua mediante el método Soxhlet utilizando etanol a partir de 500 g de material vegetal seco y molido. El extracto etanólico fue fraccionado mediante un proceso líquido-líquido empleando

solventes de polaridad creciente. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de difusión en agar con discos impregnados sobre cepas microbianas ATCC. La capacidad antioxidante se determinó mediante el método DPPH (15).

Resultados: El extracto etanólico mostró una actividad antimicrobiana significativa frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* y *Bacillus subtilis*. Los mayores porcentajes de inhibición se observaron frente a *T. mentagrophytes* (92.88%), seguido de *C. albicans* (42.59%) y *B. subtilis* (30.27%) (15).

Conclusión: El extracto etanólico de *Pelargonium odoratissimum* presentó una elevada actividad antimicrobiana, especialmente frente a hongos patógenos, lo que evidencia su potencial como fuente de compuestos bioactivos con aplicación terapéutica (15).

2.2.2. ANTECEDENTES NACIONALES

- **Huaman. J, Huallpa. V. (2024). Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Geranium filipes killip* (ajotillo) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Universidad María Auxiliadora. Lima. Perú.**

Objetivo: Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Geranium filipes* Killip (Ajotillo) frente a la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (16).

Materiales y métodos: Se realizó un estudio experimental con enfoque cuantitativo. La muestra estuvo conformada por seis kilogramos de raíces de *Geranium filipes* Killip procedentes del Cusco, a partir de las cuales se obtuvo un extracto hidroalcohólico. A dicho extracto se le realizaron pruebas de solubilidad, análisis fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post hoc de Dunn (16).

Resultado: El extracto hidroalcohólico de *Geranium filipes* Killip presentó halos de inhibición promedio de 15,2 mm, 18,5 mm y 21,5 mm para concentraciones del 40 %, 80 % y 100 %, respectivamente. El control positivo (ciprofloxacino) mostró

un halo de 31 mm, mientras que el control negativo no presentó inhibición. Se evidenció susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al extracto a concentraciones del 80 % y 100 % (16).

Conclusión: El extracto hidroalcohólico de la raíz de *Geranium filipes* Killip presenta efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, posiblemente asociado a la presencia de alcaloides y compuestos fenólicos. (16).

- **Sánchez, Talía. (2020). Comparación del efecto antibacteriano in vitro de cuatro colutorios bucales comercializados en Chiclayo sobre *Streptococcus Mutans* ATCC 25175. Universidad Señor De Sipán. Pimentel. Perú.**

Objetivo: Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de cuatro colutorios bucales comercializados en la ciudad de Chiclayo y un control positivo de gluconato de clorhexidina al 0,12 % frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (17).

Metodología: El efecto antibacteriano se evaluó mediante los métodos de difusión en disco y pocillo en agar, ambos estandarizados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se utilizó agar Mitis salivarius con bacitracina como medio de cultivo. La siembra se realizó por dispersión en superficie con hisopo estéril utilizando el método de Kirby-Bauer. La incubación se llevó a cabo a 36 °C durante 24 horas en condiciones de microaerofilia. Los halos de inhibición fueron medidos con un vernier milimétrico. (17).

Resultados: Los colutorios A y B no evidenciaron efecto antibacteriano al no presentar halos de inhibición frente a *S. mutans*. Los colutorios C y D mostraron halos promedio de 12,2 mm y 8,4 mm, respectivamente. El control positivo (gluconato de clorhexidina al 0,12 %) presentó un efecto antibacteriano significativamente mayor, observándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) (17).

Conclusión: Los colutorios A y B no presentan efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, por lo que deben considerarse colutorios cosméticos. Los colutorios C y D muestran actividad antibacteriana, aunque inferior a la del gluconato de clorhexidina al 0,12 %. (17).

- **Pineda, Neuman. Et all. (2019). Efecto irritante in vitro del gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus Megalanthus* (CACTACEAE) "PITAHAYA" por el método HET-CAM. Universidad Inca Garcilaso De La Vega. Lima. Perú.**

Objetivo: Evaluar el efecto irritante *in vitro* de un gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae), conocido como pitahaya, mediante el método HET-CAM (18).

Métodología: Para la elaboración del extracto se utilizaron 300 g del mesocarpio por litro de agua. Posteriormente, se formuló un gel a concentraciones de 0,5 % y 1 %. Como controles positivos se emplearon hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N y lauril sulfato de sodio (LSS). La evaluación de irritabilidad se realizó mediante el método HET-CAM. (18).

Resultados: El análisis fitoquímico evidenció la presencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, quinonas, glucósidos, terpenoides y fenoles. Las formulaciones del gel no produjeron alteraciones en la membrana corioalantoidea, mientras que los controles positivos presentaron efectos irritantes moderados y severos. (18).

Conclusión: El gel elaborado a partir del extracto acuoso de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" no presenta efecto irritante *in vitro*, evidenciando un perfil de seguridad favorable. (18).

2.2.3. ANTECEDENTES LOCALES

- **Claveri, Alicia. (2023). Efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas de saponinas a partir de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque SACH'A PARACCAY en *Escherichia coli* ATCC 51813. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco. Cusco. Perú.**

Objetivo: Realizar la extracción, fraccionamiento y evaluación de la actividad inhibitoria de fracciones obtenidas a partir de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* (Sach'a paraccay) (19).

Metodología: La muestra vegetal fue sometida a procesos de colecta, secado, molienda y análisis fitoquímico. Posteriormente, se realizó el fraccionamiento del

extracto etanólico al 70 % mediante cromatografía flash utilizando un sistema de polaridad ácido fórmico 0,1 % y acetonitrilo (80:20). Se obtuvieron 35 fracciones, de las cuales se agruparon seis según su perfil cromatográfico. Estas fracciones fueron evaluadas frente a *Escherichia coli* ATCC 51813 mediante pruebas de inhibición. (19).

Resultados: Dos fracciones mostraron mayor actividad inhibitoria a una concentración de 50 µL/mg, evaluada mediante el método de difusión en agar por pozos en medio Mueller-Hinton. El análisis por HPLC y cromatografía en capa fina confirmó la similitud de los cromatogramas y espectros UV con el núcleo oleanólico, evidenciando la presencia de saponinas responsables de la actividad antibacteriana (19).

Conclusión: Las fracciones ricas en saponinas obtenidas de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* presentan actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* ATCC 51813 (19).

- **Huamani, Katia. (2019). Actividad antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% y de un colutorio elaborado de la raíz de *Geranium Sessiliflorum* Cav. “CHILI CHILI” frente a *Streptococcus Mutans* ATCC 25175. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco. Cusco. Perú.**

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto seco hidroalcohólico al 70 % y del colutorio elaborado a partir de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cav. frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (20).

Metodología: El estudio fue de tipo cuasi experimental. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar por pozos excavados y Kirby-Bauer. Se formularon tres concentraciones de colutorio: 0,16 %, 0,99 % y 3,84 % (20).

Resultados: La CMI del extracto fue de 1,56 mg/mL. La mayor actividad antibacteriana se observó a la concentración de 39,89 mg/50 µL. El colutorio formulado al 3,84 % mostró una actividad antibacteriana inferior al control positivo (clorhexidina 0,12 %), con una inhibición del 85,67 %, siendo estadísticamente significativa ($p = 0,000$). (20).

Conclusión: El extracto y el colutorio elaborado a partir de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cav. presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (20).

- **Jauregui, Sarah. (2018). Evaluación de la actividad antimicótica del extracto hidroalcohólico in vitro de la raíz tuberosa de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora* var. *biumbellata rafinesque*) frente a *Malassezia furfur* cepa ATCC 14521 y formulación de shampoo anticaspa. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco. Cusco. Perú.**

Objetivo: Evaluar la actividad antimicótica *in vitro* del extracto hidroalcohólico de la raíz tuberosa de Sacha paraccay frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521 y formular un shampoo anticaspa (21).

Resultados: La concentración de 80 mg/μL del extracto hidroalcohólico presentó los mayores halos de inhibición, con un promedio de 18 mm. La formulación cosmética elaborada mostró halos de inhibición promedio de 36 mm (21).

Conclusión: El extracto hidroalcohólico y la formulación farmacéutica a base de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* presentan actividad antimicótica frente a *Malassezia furfur* ATCC 14521 (21).

- **Huaman, Yeny. Oroche, Roxana. (2016). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera Rosea* “Yawar chonq’a” Y *Geranium Sessiliflorum* “Ojotillo” frente a *Staphylococcus Aureus* CEPA ATCC Y *Escherichia Coli* CEPA ATCC Y determinación de la toxicidad aguda por vía oral. Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco. Cusco. Perú.**

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* y *Geranium sessiliflorum* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, así como evaluar su toxicidad aguda por vía oral (16).

Metodología y resultados: La actividad antibacteriana *in vitro* se realizó mediante el método de pozos excavados y la toxicidad aguda por el método “Up and Down”. La concentración mínima inhibitoria de los extractos alcohólicos al

70% de Yawar Chonq'a y ojetillo fueron 0.050 mg/50uL y 0.150 mg/50uL, respectivamente, frente a *Stafilococcus aureus*, en el caso de *Escherichia coli* fue 11 mg/50uL. Los promedios máximos de los halos de inhibición para *Stafilococcus aureus*, fueron de 21,17 mm/50uL para Yawar chonq'a y de 28,66 mm/50uL para ojetillo. Y para *Escherichia coli* fue de 17,11 mm/50uL con ambas plantas. Ninguna de las dos especies presentó toxicidad aguda por vía oral (16).

Conclusión: Los extractos etanólicos al 70% de *Oenothera rosea Aiton* "Yawar Chong'a" y *Geranium sessiliflorum Cavanilles* "Ojetillo" presentan actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* cepas ATCC 25923 en comparación a los fármacos patrón y frente a *Escherichia coli* cepas ATCC 35218 solo el extracto etanólico al 70% de *Geranium sessiliflorum Cavanilles* "Ojetillo" presenta actividad antibacteriana in vitro en comparación a los fármacos patrón. Los extractos etanólicos de *Oenothera rosea Aiton* "Yawar Chong'a" y *Geranium sessiliflorum Cavanilles* "Ojetillo" no presentan toxicidad (16).

2.3. ESTADO DEL ARTE

El uso de plantas medicinales como recurso terapéutico constituye una práctica extendida a nivel mundial y representa uno de los pilares de la medicina tradicional y complementaria. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80 % de la población mundial recurre al uso de plantas medicinales para la prevención y tratamiento de diversas afecciones, especialmente en países en vías de desarrollo donde el acceso a medicamentos sintéticos es limitado o costoso (22). Este escenario ha impulsado el interés científico por validar, mediante estudios experimentales, la eficacia y seguridad de los productos naturales.

En la actualidad, muchas plantas medicinales no solo se emplean de manera tradicional, sino que también son utilizadas como materia prima para la elaboración de medicamentos semisintéticos y fitofármacos, los cuales buscan aprovechar los principios activos naturales minimizando efectos adversos. En este contexto, la investigación científica cumple un rol fundamental al permitir la identificación de compuestos bioactivos con potencial antibacteriano y antifúngico, contribuyendo al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas frente a la creciente resistencia microbiana (22).

Las comunidades indígenas de América Latina, y particularmente del Perú, poseen un vasto conocimiento etnobotánico relacionado con el uso de plantas medicinales, el cual ha sido transmitido de generación en generación principalmente de forma oral. Este conocimiento ancestral constituye una fuente valiosa de información para la investigación científica; sin embargo, gran parte de estas especies aún carecen de estudios experimentales que respalden su uso terapéutico. Por ello, resulta imprescindible documentar, preservar y validar científicamente estos saberes tradicionales, evitando su pérdida y promoviendo su uso racional (23).

La región del Cusco destaca por conservar una rica tradición en el uso de plantas medicinales, asociada tanto a prácticas culturales como a la atención primaria de la salud. A pesar de los cambios sociales y culturales ocurridos desde la época de la conquista hasta la actualidad, el conocimiento sobre el uso, preparación y aplicación de plantas medicinales ha logrado mantenerse vigente. No obstante, muchas de estas especies continúan siendo subvaloradas desde el punto de vista científico, lo que limita su incorporación en formulaciones farmacéuticas estandarizadas (24).

Diversos estudios recientes han demostrado el potencial antimicrobiano de especies vegetales empleadas tradicionalmente en la región, particularmente aquellas pertenecientes al género *Geranium*. Investigaciones locales realizadas con *Geranium sessiliflorum* Cavanilles "Ojotillo", especie botánicamente afín *Geranium ruizii* Hieron. *vel sp.aff. (Chili chili)*, han evidenciado actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, atribuida principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, metabolitos secundarios reconocidos por su acción inhibitoria sobre microorganismos patógenos. Estos hallazgos respaldan el potencial terapéutico del género *Geranium* en afecciones de la cavidad oral, como aftas e infecciones bacterianas (16).

De manera similar, estudios experimentales realizados con *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque, variedad taxonómicamente relacionada con *Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy (*Sacha paraccay*), han demostrado actividad antifúngica, particularmente frente a *Malassezia furfur*, una levadura asociada a infecciones cutáneas. Los resultados obtenidos sugieren que las especies del género *Colignonia* poseen compuestos bioactivos con capacidad para inhibir el crecimiento fúngico, lo

que sustenta la exploración de su eficacia frente a otros hongos de relevancia clínica, como *Candida albicans* (21).

En conjunto, la evidencia científica disponible respalda el potencial antibacteriano y antifúngico de las especies vegetales seleccionadas para el presente estudio. Sin embargo, aún existe una limitada cantidad de investigaciones que evalúen estos extractos incorporados en formulaciones farmacéuticas, como los colutorios, orientados específicamente a la salud oral. En este sentido, el desarrollo y evaluación de un colutorio a base de extractos alcohólicos de *Geranium ruizii Hieron* (Chili chili) y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy* (Sacha paraccay) representa un aporte relevante al estado actual del conocimiento, al integrar la medicina tradicional con métodos científicos modernos y contribuir al desarrollo de alternativas terapéuticas naturales, seguras y accesibles.

2.4. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.4.1. PLANTA EN ESTUDIO: *Geranium ruizii Hieron. vel. sp. aff.* (Chili chili)

2.4.1.1. GENERALIDADES

Geranium ruizii Hieron. vel. sp. aff. es una especie perteneciente a la familia Geraniaceae, grupo que incluye plantas herbáceas ampliamente distribuidas en regiones templadas y de montaña. En los Andes, varias especies del género *Geranium* forman parte importante de la vegetación nativa, siendo reconocidas tanto por su valor ecológico como por sus usos tradicionales. Esta especie es conocida localmente como “chili chili”, denominación empleada en diversas comunidades altoandinas. (25)

Desde el punto de vista taxonómico, el género *Geranium* se caracteriza por especies con hojas palmadas, flores hermafroditas y frutos esquizocárpicos, rasgos que permiten su adaptación a ambientes de altura y climas variables (25).



Figura 1. *Geranium ruizii* Hieron. vel. sp. aff. (Chili chili)
Fuente: Plants of the World 2025 (25).

2.4.1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y RANGO ALTITUDINAL

Geranium ruizii Hieron. vel. sp. aff. se distribuye principalmente en regiones andinas de Sudamérica, con registros botánicos en zonas montañosas del Perú y países vecinos. Su presencia está asociada a altitudes medias y altas, desarrollándose generalmente por encima de los 2500 m s.n.m., donde predominan condiciones climáticas frías y una marcada estacionalidad (25) (26).

La ocurrencia de la especie en estos rangos altitudinales refleja su capacidad de adaptación a ambientes con alta radiación solar, bajas temperaturas nocturnas y variaciones térmicas pronunciadas, características propias de los ecosistemas altoandinos (26).

2.4.1.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino:	Plantae
Filo (División):	Streptophyta
Clase:	Equisetopsida
Subclase:	Magnoliidae
Orden:	Geraniales
Familia:	Geraniaceae
Género:	<i>Geranium</i>
Especie:	<i>Geranium ruizii</i> Hieron. vel. sp. aff.. (25)

2.4.1.4. IMPORTANCIA ECOLÓGICA Y ETNOBOTÁNICA

La importancia de *Geranium ruizii Hieron. vel. sp. aff.* radica tanto en su función ecológica como en su reconocimiento dentro del conocimiento tradicional andino. Bajo el nombre común de “chili chili”, la especie es conocida por las poblaciones locales, lo que sugiere un vínculo cultural y un potencial interés etnobotánico, aunque los estudios científicos específicos sobre sus usos aún son limitados (27).

2.4.2. PLANTA EN ESTUDIO: *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy (Sacha paraccay)*

2.4.2.1. GENERALIDADES

Colignonia parviflora (Kunth) Choisy es una especie vegetal perteneciente a la familia *Nyctaginaceae*, grupo botánico que incluye plantas con amplia capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Esta especie es nativa de Sudamérica y forma parte de la flora característica de los ecosistemas andinos, con registros en Colombia, Ecuador y Perú. Su presencia en estas regiones la convierte en un componente relevante de la vegetación nativa de zonas montañosas. (28)

Desde el punto de vista taxonómico, la especie se encuentra clasificada dentro del orden *Caryophyllales* y comparte características generales con otros géneros de la familia *Nyctaginaceae*, los cuales suelen desarrollarse en ambientes con limitaciones hídricas y suelos de baja fertilidad (28).



Figura 2. Morfología general de especies de la familia *Nyctaginaceae*.
Fuente: Chipayo Aucapuma. Et al. (2020) (17)



Figura 3. *Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy
Fuente: Plants of the World Online. Kew Science. (2025) (28).

2.4.2.2. DESCRIPCIÓN

La familia Nyctaginaceae presenta arbustos trepadores, rastreras, perennes con hojas simples, enteras, alternas, opuestas, pecioladas con raíz napiforme, sus flores unisexuales o bisexuales muy raras veces dioicas dispuestas en racimos o solitarias protegidas por brácteas vistosas o reemplazando el cáliz con estambres libres. En el gineceo se presenta ovario supero estigma simple y las semillas erectas con tegumento hialino de embrión recto con perisperma y endosperma (19).

2.4.2.3. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Caryophyllidae
Orden:	Caryophyllales
Familia:	Nyctaginaceae
Género:	<i>Colignonia</i>
Especie:	<i>Colignonia parviflora</i> (Kunth) Choisy (28).

2.4.2.4. IMPORTANCIA ECOLÓGICA

Aunque la información específica sobre las interacciones ecológicas de *C. parviflora* es limitada, por analogía con otras especies de la familia Nyctaginaceae se considera que participa en procesos de polinización mediada por insectos de pequeño tamaño. Sus flores pueden constituir una fuente de recursos para polinizadores locales en ecosistemas andinos (29).

Desde una perspectiva ecológica, la especie cumple un rol importante en la estructura de la vegetación, contribuyendo a la cobertura vegetal, la estabilidad del suelo y la generación de microhábitats para organismos asociados al estrato arbustivo (29).

2.4.3. METABOLITOS SECUNDARIOS ASOCIADOS CON LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA

En los extractos vegetales pueden hallarse metabolitos secundarios con efectos antimicrobianos, entre ellos los terpenoides, compuestos fenólicos, estilbenos, fenilpropanoides, alcaloides y saponinas. Dentro de estos compuestos, los fenólicos como los flavonoides y los fenoles presentan una notable actividad antimicrobiana, observada particularmente contra hongos patógenos como *Candida spp* (30).

Se cree que su acción antimicrobiana puede deberse a la capacidad de frenar la germinación de los conidios, así como a la interferencia en rutas metabólicas clave (como las del fosfoenolpiruvato, eritrosa-4-fosfato y ácido shiquímico), lo cual modifica la síntesis de aminoácidos esenciales, favoreciendo la producción de triptófano y reduciendo la generación de fenilalanina y tirosina (30).

- **Flavonoides:**

Presentes en todas las plantas verdes, los flavonoides son metabolitos secundarios que cumplen un papel crucial en la defensa vegetal contra agentes patógenos. Estos compuestos no solo tienen la capacidad de eliminar bacterias, sino que también impiden que estas formen biopelículas, estructuras microbianas cohesionadas por una sustancia producida por los propios organismos. Además, los flavonoides pueden actuar en conjunto con antibióticos tradicionales, mejorando su capacidad para

eliminar bacterias. Su mecanismo de acción incluye la alteración de la membrana bacteriana, específicamente al perturbar las bicapas lipídicas, así como la inhibición de procesos clave como la cadena respiratoria y la síntesis de ATP (31).

- **Taninos:**

Como metabolitos secundarios presentes en numerosas especies vegetales, estos compuestos se perfilan como una alternativa prometedora a los antibióticos tradicionales. Su eficacia se debe a su capacidad para captar el hierro, bloquear la formación de la pared celular y alterar la integridad de las membranas celulares. También son capaces de interferir en rutas biosintéticas clave y dificultar la creación de biopelículas en bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (31).

- **Compuestos fenólicos:**

Debido a su diversidad estructural, los polifenoles pueden actuar de distintas maneras para neutralizar a las bacterias en sus células objetivo. Cabe señalar que muchas investigaciones no evalúan polifenoles individuales, sino mezclas de diferentes clases. Así, se considera que su actividad antibacteriana es el resultado de una interacción compleja entre varios elementos (32).

- **Alcaloides:**

Los alcaloides poseen una destacada capacidad para combatir microorganismos, incluyendo bacterias gramnegativas, grampositivas y hongos. Su efecto es similar al que ofrecen los antibacterianos comerciales ampliamente empleados (30).

2.4.4. BACTERIA EN ESTUDIO: *Streptococcus mutans*

2.4.5.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Streptococcus mutans pertenece al grupo de bacterias grampositivas asociadas a la microbiota oral humana. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacili
Orden:	Lactobacillales
Familia:	Streptococcaceae
Género:	<i>Streptococcus</i>
Especie:	<i>Streptococcus mutans</i> (33).

2.4.5.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y GENERALES

Streptococcus mutans es una bacteria grampositiva de morfología cocoide, que suele disponerse en pares o cadenas cortas. Es un microorganismo anaerobio facultativo que fue aislado e identificado por primera vez por Clarke en 1924. Su nombre deriva de la capacidad de presentar variaciones morfológicas según las condiciones ambientales, adoptando formas ovoides en medios ácidos y formas esféricas en medios alcalinos. En agar sangre, las colonias son pequeñas, con un diámetro aproximado de 0,5 a 1 mm, lo que facilita su identificación. Estructuralmente, presenta una membrana citoplasmática y una pared celular rica en mureína. Un rasgo distintivo es la presencia de proteínas fijadoras de glucanos en la pared celular, las cuales desempeñan un papel fundamental en la adhesión a la película adquirida del esmalte dental y en la formación de biopelículas (34).

Esta bacteria forma parte del microbiota normal de la cavidad oral, apareciendo generalmente después de la erupción dentaria. En niños, su transmisión ocurre principalmente a través de la saliva, especialmente de la madre al hijo (34)

2.4.5.3. CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA

Según la composición y los enlaces de los polisacáridos de su pared celular, los estreptococos del grupo mutans se clasifican en diferentes serotipos. Se han descrito ocho serotipos principales, distribuidos entre varias especies, entre ellas *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k), *Streptococcus sobrinus* (d y g), *Streptococcus rattus* (b), *Streptococcus cricetus* (a), *Streptococcus ferus* (c), *Streptococcus downei* (h) y *Streptococcus macacae* (c). De todos ellos, el serotipo c de *Streptococcus mutans* es el más prevalente en la cavidad oral humana (35).

2.4.5.4. SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Además de su papel en la patogénesis de la caries dental, *Streptococcus mutans* también se ha asociado a infecciones sistémicas como la endocarditis infecciosa, lo que ha motivado el estudio de su susceptibilidad frente a diversos agentes antimicrobiano (34).

Diversos estudios han demostrado que *Streptococcus mutans* presenta sensibilidad variable frente a antibióticos como penicilina, amoxicilina, cefazolina, eritromicina, clindamicina, imipenem y vancomicina, con porcentajes de inhibición que oscilan entre el 50 % y el 90 %. Sin embargo, la aparición de resistencia antimicrobiana ha impulsado la búsqueda de alternativas terapéuticas, incluyendo compuestos de origen natural (34).

2.4.5. HONGO EN ESTUDIO: *Candida albicans*

2.4.6.1. CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

Candida albicans es un hongo levaduriforme perteneciente al reino Fungi, con la siguiente clasificación taxonómica:

Reino:	Fungi
Filo:	Ascomycota
Subfilo:	Saccharomycotina
Clase:	Saccharomycetes

Orden:	Saccharomycetales
Familia:	<i>Saccharomycetaceae</i>
Género:	<i>Candida</i>
Especie:	<i>Candida albicans</i> (36).

2.4.6.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Candida albicans es un microorganismo comensal presente de forma habitual en la microbiota humana; no obstante, bajo determinadas condiciones puede comportarse como patógeno oportunista. Se estima que este hongo está implicado en aproximadamente el 75 % de las infecciones por *Candida* en pacientes hospitalizados, con tasas de mortalidad elevadas en casos sistémicos (37).

Morfológicamente, crece como levadura en forma ovalada o redondeada, con un tamaño aproximado de 4 a 6 µm. Su identificación se basa en características morfológicas, bioquímicas y enzimáticas, como la capacidad de fermentación y la formación de tubos germinales e hifas. Presenta un crecimiento rápido en agar Sabouraud y agar sangre, formando colonias blanquecinas de 2 a 4 mm tras 24 horas de incubación (38).

2.4.6.3. PATOGÉNESIS

La patogenicidad de *Candida albicans* está estrechamente relacionada con su capacidad de cambiar de la forma de levadura a la forma filamentosa (hifas), lo que facilita la invasión de los tejidos del hospedador. Este cambio morfológico puede ser inducido por factores ambientales como el pH, la temperatura, la presencia de suero y la disponibilidad de nutrientes (38).

En muestras histopatológicas, la presencia de hifas suele indicar un proceso invasivo, mientras que en condiciones in vitro estos cambios pueden ser controlados mediante la manipulación de las condiciones de cultivo (38).

2.4.6.4. CANDIDIASIS OROFARÍNGEA

La candidiasis orofaríngea es una infección oportunista que se origina por un desequilibrio entre el hospedador y *Candida albicans*. Es frecuente en pacientes inmunodeprimidos, así como en aquellos sometidos a tratamientos con antimicrobianos, fármacos citotóxicos o radioterapia (39).

Clínicamente, puede presentarse en formas agudas, como la pseudomembranosa y la eritematosa, y en formas crónicas, incluyendo la hiperplásica. Estas manifestaciones se caracterizan por la presencia de placas blanquecinas, eritema, dolor y sensación de ardor en la mucosa oral (40).

2.4.6. CEPAS ATCC

Las cepas ATCC (American Type Culture Collection) son utilizadas como patrones de referencia para garantizar la calidad, reproducibilidad y confiabilidad de los ensayos microbiológicos. Estas cepas certificadas conservan características genotípicas y fenotípicas estables, lo que permite validar métodos diagnósticos y ensayos de actividad antimicrobiana en los ámbitos farmacéutico, cosmético, alimentario y clínico (41).

2.4.7. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA

La actividad antibacteriana y antifúngica se define como la capacidad de una sustancia para inhibir o eliminar el crecimiento de bacterias y hongos, sin causar toxicidad significativa a los tejidos sanos del hospedador (42).

a. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) corresponde a la menor concentración de un agente antimicrobiano, expresada en $\mu\text{g/mL}$, capaz de inhibir visiblemente el crecimiento de un microorganismo específico bajo condiciones controladas (43). La determinación de la CMI requiere un entorno experimental estandarizado, considerando variables como el pH, la temperatura, el tipo de medio de cultivo, la disponibilidad de oxígeno y la concentración de nutrientes, factores que pueden influir en la exactitud de los resultados (44).

Según la respuesta del microorganismo, los resultados se interpretan como:

- S (sensible): el microorganismo es inhibido con concentraciones habituales del antimicrobiano (45).
- I (intermedia): se requiere una dosis elevada para inhibir el crecimiento (45).
- R (resistente): no se logra inhibición con concentraciones terapéuticas habituales (45).

b. Concentración mínima bactericida o fungicida

La concentración mínima bactericida (CMB) o fungicida corresponde a la menor concentración de un agente antimicrobiano capaz de eliminar completamente una población bacteriana o fúngica viable (43).

2.4.8. MÉTODO DE DILUCIÓN

El método de dilución es una técnica cuantitativa ampliamente utilizada para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de agentes antimicrobianos, tanto antibióticos convencionales como compuestos de origen natural. Este método se fundamenta en la exposición de un microorganismo a concentraciones decrecientes de una sustancia antimicrobiana, con el fin de identificar la menor concentración capaz de inhibir el crecimiento microbiano visible bajo condiciones controladas (46).

La CMI se define como la concentración mínima del agente antimicrobiano que impide el crecimiento visible de un microorganismo después de un período determinado de incubación. Este parámetro constituye un indicador esencial para evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de una sustancia, así como para comparar su eficacia frente a diferentes cepas microbianas (46).

2.4.9.1. FUNDAMENTO DEL MÉTODO DE DILUCIÓN

El fundamento del método de dilución se basa en la interacción directa y uniforme entre el agente antimicrobiano y el microorganismo en un medio líquido, lo que permite una evaluación precisa de la inhibición del crecimiento. A diferencia de los métodos de difusión, en los cuales la actividad antimicrobiana depende de la capacidad de difusión del compuesto en un medio sólido, el método de dilución garantiza que el

microorganismo esté en contacto con concentraciones conocidas y homogéneas del agente evaluado (46).

Este método permite además diferenciar si el efecto observado es bacteriostático o bactericida, mediante la posterior evaluación de la viabilidad microbiana en ausencia del agente antimicrobiano, lo cual resulta especialmente relevante en estudios experimentales con extractos vegetales y productos naturales (46).

2.4.9.2. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN

La microdilución es una variante del método de dilución que se realiza en microplacas, generalmente de 96 pocillos, y constituye una técnica altamente sensible, reproducible y eficiente para la determinación de la CMI en un gran número de muestras simultáneamente (47).

En este método, se preparan diluciones seriadas del agente antimicrobiano en un medio de cultivo líquido, a las cuales se les adiciona una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Tras la incubación bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo, se evalúa el crecimiento microbiano mediante la observación visual de la turbidez o mediante métodos instrumentales (47).

La principal ventaja de la microdilución frente a los métodos de difusión radica en su mayor sensibilidad para detectar la actividad antimicrobiana a bajas concentraciones, lo cual es particularmente importante cuando se evalúan extractos vegetales o sustancias con limitada capacidad de difusión en medios sólidos (44).

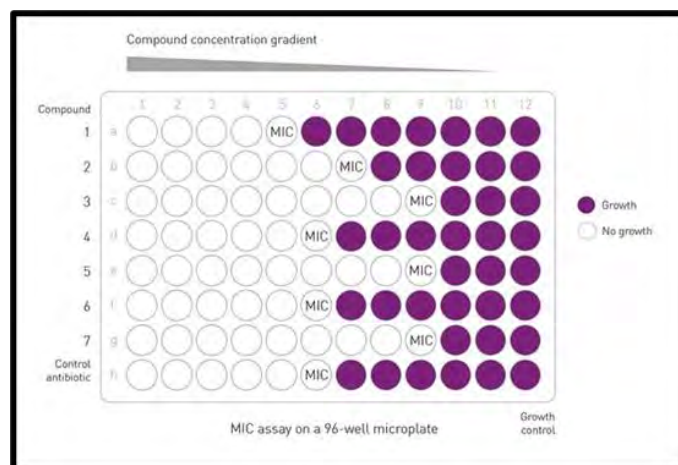


Figura 4. Ensayo de concentración mínima inhibitoria en una placa de 96 pocillos.
Fuente: Whyte Barry (44)

Lectura e interpretación de resultados:

El uso de lectores de microplacas permite automatizar y optimizar la determinación de la CMI, proporcionando lecturas objetivas y reproducibles mediante la medición de la absorbancia. Estos dispositivos son compatibles con microplacas de diferentes formatos (96, 384 y 1536 pocillos), lo que facilita el análisis simultáneo de múltiples concentraciones del agente antimicrobiano y diferentes cepas microbianas (47).

La CMI se identifica como la concentración más baja del agente antimicrobiano en la cual no se observa crecimiento visible del microorganismo, en comparación con el control de crecimiento. Este valor constituye un parámetro fundamental para la evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los compuestos en estudio (47).

2.4.9. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

El método Kirby-Bauer, o ensayo de difusión por disco, se utiliza como técnica para analizar la respuesta de los microorganismos a los antibióticos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de la placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneo con la bacteria a estudiar y sobre la cual se ha depositado un disco antibiótico o uno de papel filtro impregnado con la sustancia a demostrar el efecto respectivo (47).

- **Base del método de Kirby-Bauer por difusión en disco:**

El organismo bajo estudio debe incubarse en caldo por al menos una noche y ajustarse visualmente al patrón de turbidez 0,5 de McFarland. Se requiere el uso de agar Mueller-Hinton que permite reproducibilidad del ensayo y no afecta la acción de sulfonamidas, además de mantener condiciones óptimas de pH y nutrientes. Al preparar las placas de Petri, el espesor del agar debe ser de exactamente 4 mm (45).

- **Interpretación de los resultados del método de difusión por disco de Kirby-Bauer:**

Una vez transcurridas 24 horas de incubación, se utiliza una regla para medir el halo de inhibición, considerando también el tamaño del disco en dicha medición. Los datos obtenidos se contrastan con los estándares establecidos, y los resultados se categorizan como Susceptible (S), Intermedio (I) o Resistente (R) (45).

2.4.11. COLUTORIO

Los colutorios son preparaciones farmacéuticas líquidas de administración tópica, destinadas al contacto directo con las estructuras de la cavidad oral mediante enjuagues, sin ser ingeridas. Su finalidad principal es complementar la higiene oral mecánica, permitiendo la distribución homogénea de principios activos sobre dientes, encías y mucosa oral, con fines preventivos, terapéuticos o cosméticos (48).

Desde el punto de vista farmacéutico, los colutorios se formulan principalmente como soluciones acuosas, aunque pueden presentar un incremento controlado de viscosidad para prolongar el tiempo de contacto del principio activo con los tejidos orales. Esta característica resulta especialmente relevante en formulaciones con agentes antimicrobianos, ya que favorece una mayor eficacia biológica (49).

2.4.11.1. IMPORTANCIA DE LOS COLUTORIOS EN SALUD BUCAL

El uso de colutorios ha demostrado ser un coadyuvante eficaz en el control del biofilm oral, contribuyendo a la reducción de microorganismos implicados en patologías como caries dental, gingivitis, mucositis y candidiasis oral. Su aplicación resulta particularmente útil en pacientes con dificultades para realizar una higiene oral adecuada o en situaciones clínicas que requieren un control químico de la microbiota oral (50).

En investigaciones recientes, los colutorios formulados con principios activos de origen vegetal han cobrado especial interés debido a su potencial antimicrobiano, menor riesgo de efectos adversos y buena aceptabilidad, constituyéndose como alternativas complementarias a los antisépticos sintéticos convencionales (51).

2.4.11.2. FUNDAMENTO FARMACOTÉCNICO DE LA FORMULACIÓN DE COLUTORIOS

La formulación de un colutorio debe garantizar estabilidad físico-química, eficacia biológica, seguridad y aceptabilidad organoléptica. Para ello, se emplea una combinación racional de excipientes que cumplen funciones específicas dentro de la preparación (49) (52).

Formulación patrón de un colutorio

Componente	Función farmacéutica	Rango porcentual
Tensioactivo	Solubilización y estabilidad	0 – 2 %
Humectante	Retención de humedad y viscosidad	0 – 15 %
Edulcorante	Mejora organoléptica	0.1 – 2 %
Espesante	Aumento de viscosidad	1 – 2 %
Principio activo	Acción terapéutica	Variable
Agua purificada	Vehículo	c.s.p

Tabla 1. Formulación patrón del colutorio (49) (52).

Esta formulación patrón es ampliamente utilizada en el desarrollo de colutorios experimentales, incluidos aquellos elaborados con extractos vegetales, debido a su versatilidad y reproducibilidad en estudios in vitro (53).

2.4.11.3. JUSTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN

- **Tensioactivos:** Los tensioactivos son sustancias anfipáticas que reducen la tensión superficial del sistema, facilitando la solubilización de componentes lipofílicos, como aceites esenciales o extractos vegetales. En colutorios, se emplean preferentemente tensioactivos no iónicos o catiónicos, estos últimos con actividad antimicrobiana adicional (52).
- **Humectantes:** Sustancias como la glicerina y el sorbitol cumplen la función de retener humedad, aumentar la viscosidad y mejorar la estabilidad del producto. Además, contribuyen a la sensación de suavidad y evitan la desecación de la mucosa oral (49).
- **Edulcorantes:** Los edulcorantes y aromatizantes se incorporan para mejorar la aceptabilidad del colutorio. Es fundamental que sean no cariogénicos y compatibles con el pH oral, evitando efectos adversos sobre el esmalte dental y los tejidos gingivales (48).
- **Espesantes:** Los agentes espesantes incrementan la viscosidad de la formulación, permitiendo una mayor adhesión a la mucosa oral y prolongando

la acción del principio activo. Este aspecto resulta relevante en colutorios con finalidad antimicrobiana y antifúngica (53).

- **Principio activo:** El principio activo es el responsable de la acción terapéutica del colutorio. En formulaciones experimentales, los extractos vegetales constituyen una fuente importante de compuestos bioactivos, como flavonoides, taninos y fenoles, reconocidos por su actividad antibacteriana y antifúngica (51).

2.4.11.4. CLASIFICACIÓN DE LOS COLUTORIOS

Los colutorios se clasifican principalmente en:

- **Colutorios cosméticos:** Destinados al control temporal del mal aliento y al aporte de frescor, sin acción terapéutica significativa.
- **Colutorios terapéuticos:** Contienen principios activos con evidencia científica para la prevención o tratamiento de enfermedades bucodentales, incluyendo agentes antimicrobianos, antiinflamatorios y antifúngicos (50).

Los colutorios elaborados con extractos vegetales se incluyen dentro del grupo de colutorios terapéuticos, siempre que demuestren actividad biológica mediante estudios experimentales controlados (53).

2.4.12. MEDICAMENTOS CONVENCIONALES UTILIZADOS COMO REFERENCIA TERAPÉUTICA EN MUCOSITIS ORAL

En la práctica clínica, el manejo farmacológico de la mucositis oral depende de la etiología y de la presencia de infecciones secundarias bacterianas o fúngicas. En este contexto, antibióticos y antifúngicos convencionales son utilizados como tratamiento complementario, motivo por el cual se consideran como medicamentos patrón para la evaluación comparativa de nuevas alternativas terapéuticas, incluyendo formulaciones a base de productos naturales.

2.4.12.1. AMOXICILINA

La amoxicilina es un antibiótico perteneciente al grupo de las penicilinas semisintéticas de amplio espectro. Presenta buena absorción por vía oral, lo que permite alcanzar concentraciones plasmáticas eficaces para el tratamiento de infecciones bacterianas asociadas a la cavidad oral (54).

Desde el punto de vista farmacocinético, la amoxicilina presenta una biodisponibilidad oral aproximada del 80%, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre una y dos horas y media después de su administración. Su distribución es amplia en los tejidos, aunque no alcanza concentraciones significativas en el sistema nervioso central. La eliminación se realiza principalmente por vía renal en forma inalterada, con una vida media cercana a una hora, la cual puede prolongarse en pacientes con insuficiencia renal (54).

La amoxicilina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana mediante su unión a las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs), lo que conduce a la lisis celular y muerte bacteriana. Sin embargo, la resistencia puede desarrollarse por la producción de betalactamasas o por modificaciones estructurales en las PBPs, reduciendo la afinidad del antibiótico por su sitio diana (54).

En el ámbito odontológico, la amoxicilina se emplea principalmente para el tratamiento de infecciones bacterianas secundarias asociadas a procesos inflamatorios de la cavidad oral, tales como abscesos dentales e infecciones odontogénicas, las cuales pueden coexistir con cuadros de mucositis oral (54).

2.4.12.2. NISTATINA

La nistatina es un antifúngico perteneciente al grupo de los macrólidos poliénicos, ampliamente utilizado en el tratamiento de infecciones por *Candida spp.*, especialmente a nivel de la mucosa oral. Su uso es frecuente en casos de mucositis oral asociada a candidiasis, particularmente en pacientes inmunocomprometidos o sometidos a terapias antibióticas prolongadas (55).

Farmacocinéticamente, la nistatina no se absorbe por vía gastrointestinal, por lo que su acción se limita al sitio de aplicación. Es eliminada en forma inalterada por las heces, lo que reduce el riesgo de efectos sistémicos (55).

Su mecanismo de acción se basa en la unión al ergosterol de la membrana celular fúngica, produciendo un aumento de la permeabilidad de la membrana y la consecuente pérdida de componentes intracelulares esenciales, lo que conduce a la inhibición del crecimiento o a la muerte del hongo (55).

La nistatina está indicada principalmente para el tratamiento de la candidiasis oral, condición frecuentemente asociada a la mucositis, donde contribuye al control de la carga fúngica y a la mejora de las lesiones mucosas (55).

2.4.13. PRUEBA DE IRRITACIÓN

El ensayo HET-CAM (*Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*) es un método alternativo validado por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, Ispra, Italia) y aceptado por diversas entidades regulatorias internacionales, debido a su alta capacidad predictiva del potencial irritante, comparable con métodos *in vivo* tradicionales (56).

Esta prueba constituye una alternativa ética al uso de animales de experimentación y se caracteriza por ser un método rápido, sencillo, reproducible y de bajo costo, ampliamente utilizado para evaluar el potencial toxicológico e irritante de sustancias activas y formulaciones farmacéuticas destinadas a contacto con tejidos sensibles, como la mucosa oral (57).

El ensayo tiene como objetivo determinar el índice de irritación (I.I.), mediante la simulación del contacto de la sustancia en estudio con la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo. Esta membrana es un tejido altamente vascularizado, compuesto por arterias, venas y capilares, lo que permite observar de forma inmediata respuestas inflamatorias similares a las que ocurren en las membranas mucosas humanas (57).

Durante la prueba HET-CAM, las muestras botánicas, extractos o formulaciones son aplicadas directamente sobre la CAM, y se evalúan los cambios vasculares inducidos, tales como hemorragia, lisis y coagulación, los cuales actúan como indicadores del potencial irritante de la sustancia sobre tejidos biológicos *in vivo* (58).

Para la ejecución del ensayo, los huevos de gallina se incuban hasta el noveno día de desarrollo embrionario. Posteriormente, se realiza una apertura cuidadosa de la

cáscara para exponer la membrana corioalantoidea, sobre la cual se aplica la muestra a evaluar. La respuesta se observa durante un periodo de cinco minutos, registrándose el tiempo de aparición de los signos vasculares mencionados (58).

El índice de irritación se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$I.I. = ((301-TH)/300) \times 5 + ((301-TL)/300) \times 7 + ((301-TC)/300)$$

Dónde:

I.I: índice de irritación

TH: tiempo de aparición de hemorragia

TL: tiempo de aparición de lisis

TC: tiempo de aparición de coagulación (59)

De acuerdo con el valor obtenido del índice de irritación, las sustancias evaluadas se clasifican según su grado de irritabilidad, tal como se muestra en la Tabla 2.

GRADO DE IRRITACIÓN	
RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS DE IRRITACIÓN
0 – 0,9	No irritante
1,0 – 4,9	Irritante leve
5,0 – 8,9	Irritante moderado
9,0 – 21,0	Irritante severo

Tabla 2. Clasificación para determinar la irritabilidad mediante método HET-CAM (59)

2.5. MARCO CONCEPTUAL

1. **Agentes citotóxicos:** Compuesto que va a demorar o detener el crecimiento celular, incluidas las células cancerosas, pero no llega a destruirlas. Este tipo de sustancias logran imposibilitar que los tumores crezcan (60).
2. **Antibacteriano:** Sustancia que va impedir el crecimiento o va a destruir a las bacterias (34).
3. **Antifúngicos:** Son medicamentos usados para el tratamiento de infecciones por hongos. Estos pueden ser fungistáticos o fungicidas (20).
4. **Bacterias:** Microorganismos unicelulares que presentan vida libre a excepción de Chlamydias y Rickettsias las cuales presentan obligatoriamente una vida intracelular. La clasificación teniendo en cuenta tipo celular es eucariotas y procariotas donde en ambas se presenta estructuras similares como los ribosomas, la membrana celular y el ácido desoxirribonucleico (ADN) el cual es el portador de la información genética (34).
5. **Cáncer:** El cáncer a nivel del ser humano puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo ya que se produce un crecimiento incontrolado de las células las cuales superan en número a las células normales lo que origina un inadecuado funcionamiento normal del cuerpo (60).
6. **Colutorio:** Es una forma farmacéutica acuosas de cierta viscosidad. Los componentes de estos por lo general van a servir para tratar afección que se localizan a nivel bucal (61).
7. **Desecación:** Es un tipo de sistema que se utiliza mayormente en varios países en desarrollo. El cual consiste en desparramar el material en el suelo o sobre algunas esteras, el cual es secado en la sombra (62).
8. **Extracción:** Es un método en el cual se observa una interacción droga-disolvente. Dependerá del tipo de principio activo el cual se quiere aislar para elegir el método más adecuado (62).
9. **Fármacos antineoplásicos:** Fármacos que van a impedir o evitar la formación del cáncer (60).
10. **In vitro:** Refiere a que se produjo en un laboratorio por métodos experimentales (20).

- 11. Inhibición:** Mecanismo por el cual se va a impedir o reprimir el crecimiento (21).
- 12. Microorganismo:** Son seres vivos microscópicos, que tienen la capacidad de realizar procesos vitales sin ninguna interferencia (63).
- 13. Mucositis:** Es una afección el cual se caracteriza por presentar inflamación y dolor a nivel de la mucosa, esto a consecuencia de la disminución de la producción de células epiteliales. Puede llegar a generar ulceraciones e incluso infecciones (64).
- 14. Principio activo:** Sustancia química o la mezcla de las mismas las cuales pueden ser de origen natural o sintético que poseen específicamente un efecto farmacológico (62).
- 15. Quimioterapia:** Procedimiento en el cual se realiza la administración de fármacos usados en el tratamiento del cáncer (60).
- 16. Radioterapia:** Tratamiento empleado en el cáncer donde se usa altas dosis de radiación con el objetivo de destruir células cancerosas (65).
- 17. Maceración:** Es un método extractivo el cual consiste en el contacto prolongado de una droga con el menstruo (62).
- 18. Ulceras bucales:** Son lesiones en las cuales se observa inflamación, dolor y eritema (64).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. MATERIAL VEGETAL

- Chili Chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*)
- Sacha Paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*)

3.1.2. MATERIAL MICROBIANO

- Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231
- Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

3.2.1. MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizaron medios de cultivo deshidratados de alta pureza, preparados según las especificaciones del fabricante y esterilizados en autoclave

- Agar Sabouraud
- Agar Sangre
- Agar Mueller-Hinton
- Caldo BHI (Brain Heart Infusion)
- Caldo Sabouraud

3.2.2. MATERIALES DE VIDRIO Y METAL

Se empleó material de vidrio borosilicato de clase A (resistente a altas temperaturas y corrosión química) y utensilios de acero inoxidable:

- **Material volumétrico:** Fiolas (50 y 100 mL), pipetas graduadas y volumétricas, y probetas (100, 250 y 500 mL) con certificados de tolerancia.
- **Material de contención:** Vasos de precipitado (50 y 100 mL), matraces Erlenmeyer (250 y 500 mL) y tubos de ensayo de diversas dimensiones (13x100 mm, 16x150 mm).
- **Material complementario:** Baguetas de vidrio, embudos de filtración, placas Petri de vidrio y láminas porta/cubreobjetos.

- **Instrumental metálico:** Pinzas de disección, soporte universal con pinzas de nuez, gradillas de acero inoxidable y asas de siembra bacteriológica (asa de nicromo).
- **Material de almacenamiento:** Frascos de vidrio color ámbar (10, 20, 50 y 500 mL) para la protección de extractos fotosensibles.

3.2.3. INSTRUMENTOS DE PRECISIÓN Y AUXILIARES

- **Micropipetas monocanal:** Con rangos variables de 10-100 μL y 100-1000 μL , debidamente calibradas.
- **Bureta de precisión:** De 100 mL para procesos de titulación o medición de volúmenes exactos.
- **Material de consumo:** Discos de papel filtro Whatman N°1 (para filtración de extractos y preparación de discos de sensibilidad), algodón hidrófilo y papel indicador de pH.
- **Generadores de calor:** Mechero Bunsen para crear ambiente estéril y cocinilla eléctrica de un hornillo.

3.2.4. EQUIPOS DE LABORATORIO

- **Balanza analítica:** Para el pesaje de precisión de extractos y reactivos.
- **Baño María:** Para la evaporación controlada del solvente a 40-45 °C.
- **Autoclave:** Para la esterilización de medios de cultivo y materiales.
- **Incubadora:** Permite crecimiento estandarizado de cepas ATCC.
- **Estufa eléctrica:** Para secado de material de vidrio y muestras botánicas.
- **Agitador magnético:** Para la homogeneización de la fórmula del colutorio.
- **Potenciómetro:** Para medición del pH final del colutorio elaborado.

3.2.5. INSUMOS

Todos los insumos utilizados para la elaboración de la forma farmacéutica líquida cumplen con las especificaciones de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos):

- **Lauril éter sulfato de sodio:** Agente tensioactivo (espumante).
- **Glicerina:** Agente humectante y edulcorante.
- **Sorbitol 70%:** Agente espesante y estabilizante (sustituto de azúcar).
- **Sacarina sódica:** Edulcorante artificial de alta intensidad.
- **Saborizantes y aromatizantes:** Grado alimentario/farmacéutico (menta o eucalipto).

3.3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1. DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Este estudio se considera de tipo cuasiexperimental porque manipulas deliberadamente una variable independiente (las concentraciones de los extractos alcohólicos de *Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.* y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy* para observar su efecto en una variable dependiente (inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*).

3.3.1.2. NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio es explicativo porque se busca establecer relaciones de causalidad (efecto antibacteriano/antifúngico de los extractos frente a las cepas microbianas). También tiene un componente comparativo, pues se contrasta la eficacia de los extractos con antibióticos/antifúngicos patrones con colutorios comerciales.

3.3.2. DISEÑO DE PRUEBA ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO

DISEÑO DE POST PRUEBA Y PRUEBA CONTROL

3.3.2.1. Determinación de la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de Chili Chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) frente a *Streptococcus mutans*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
⋮	⋮	⋮
G _x	X _x	O _x
G _{x+i}	X _{x+1}	O _{x+1}

Tabla 3. Actividad antibacteriana del extracto alcohólico de Chili Chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) frente a *Streptococcus mutans*

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

- $G_1, G_2, \dots, G_x, G_{x+1}$: Cepas estándar de *Streptococcus mutans*.
- X_1, X_2, \dots, X_x : Diferentes concentraciones en mg/ml del extracto alcohólico de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) sembrado en placa Petri por triplicado por el método de discos.
- X_{x+1} : Concentración de fármaco patrón (Amoxicilina).
- $O_1, O_2, \dots, O_x, O_{x+1}$: Observación y medición de los halos de inhibición a las 24 horas.

3.3.2.2. Determinación de la actividad antifúngica del extracto alcohólico de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) frente a *Candida albicans*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G_1	X_1	O_1
G_2	X_2	O_2
\vdots	\vdots	\vdots
G_x	X_x	O_x
G_{x+i}	X_{x+1}	O_{x+1}

Tabla 4. Actividad antifúngica del extracto alcohólico de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) frente a *Candida albicans*

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

- $G_1, G_2, \dots, G_x, G_{x+1}$: Cepas estándar de *Candida albicans*.
- X_1, X_2, \dots, X_x : Diferentes concentraciones en mg/ml del extracto alcohólico de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) que serán sembrados en placa Petri por triplicado por el método de discos.
- X_{x+1} : Concentración de fármaco patrón (Nistatina).
- $O_1, O_2, \dots, O_x, O_{x+1}$: Observación y medición de los halos de inhibición a las 24 horas.

3.3.3. DISEÑO DE PRUEBA ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DEL COLUTORIO ELABORADO

DISEÑO DE PRUEBA, POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL

3.3.3.1. Determinación de la actividad antibacteriana de colutorio elaborado a base del extracto alcohólico de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) frente a *Streptococcus mutans*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
G ₃	X ₃	O ₃
G ₄	X ₄	O ₄
G ₅	X ₅	O ₅
G ₆	-	O ₆

Tabla 5. Actividad antibacteriana de colutorio elaborado a base del extracto alcohólico de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) frente a *Streptococcus mutans*

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆: Cepas estándar de *Streptococcus mutans*.
- X₁: Colutorio elaborado con extracto alcohólico de Chili Chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*)
- X₂: Colutorio elaborado con extracto alcohólico de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*).
- X₃: Colutorio elaborado con 50% de extracto alcohólico de Chili Chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y 50% de extracto alcohólico de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*).
- X₄: Colutorio Bucoxidina 0.05%.
- X₅: Colutorio Perio- Aid®.
- - : Ausencia de estímulo.
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición en 24 horas.

3.3.3.2. Determinación de la actividad antifúngica del colutorio elaborado a base del extracto alcohólico de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) frente a *Candida albicans*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
G ₃	X ₃	O ₃
G ₄	X ₄	O ₄
G ₅	X ₅	O ₅
G ₆	-	O ₆

Tabla 6. Actividad antifúngica del colutorio elaborado a base del extracto alcohólico de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) frente a *Candida albicans*

Fuente: Elaboración propia

Dónde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆: Cepas estándar de *Candida albicans*.
- X₁: Colutorio elaborado con extracto alcohólico de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*).
- X₂: Colutorio elaborado con extracto alcohólico de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*).
- X₃: Colutorio elaborado con 50% de extracto alcohólico de Chili Chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y 50% de extracto alcohólico de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*).
- X₄: Colutorio Bucoxidina 0.05%.
- X₅: Colutorio Perio- Aid®.
- - : Ausencia de estímulo.
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición en 24 horas.

3.4. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1. VARIABLES IMPLICADAS

3.4.1.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

- I. **Extracto alcohólico al 70% de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*)**

Definición conceptual: El extracto alcohólico al 70% de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) corresponde a la solución obtenida a partir de toda la planta empleando etanol al 70% como solvente. Se obtiene mediante el proceso de maceración y posterior evaporación hasta sequedad (66).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
- **Tipo de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Procedimiento de medición:** Se pesa el extracto seco alcohólico en miligramos luego se realizan las diluciones con los disolventes adecuados. (mL).
- **Indicadores:** Cantidad de extracto disuelto/cantidad de solvente.
- **Expresión final:** mg/ mL

- II. **Extracto alcohólico al 70% de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*)**

Definición conceptual: El extracto alcohólico al 70% de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) se define como la sustancia obtenida a partir de la raíz de la planta, empleando etanol al 70% como solvente. Se obtiene por maceración y posterior evaporación hasta sequedad (21).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
- **Tipo de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.

- **Procedimiento de medición:** Se pesa el extracto alcohólico seco en miligramos y se realizan las diluciones correspondientes con los disolventes adecuados (mL)
- **Indicadores:** Cantidad de extracto disuelto/cantidad de solvente.
- **Expresión final:** mg/ mL

III. Colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii*

Definición conceptual: Preparado líquido formulado a base del extracto alcohólico de *Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.* al 70%, diseñado para uso bucal y evaluación microbiológica (67).

Definición operacional

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón
- **Procedimiento de medición:** Se pesa el extracto alcohólico y se lleva a una forma farmacéutica líquida (colutorio).
- **Indicadores:** Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.
- **Expresión final:** mg/ mL

IV. Colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora*

Definición conceptual: Preparado líquido formulado a base del extracto alcohólico al 70% de *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*, diseñado para uso bucal y evaluación microbiológica (67).

Definición operacional

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón
- **Procedimiento de medición:** Se pesa el extracto alcohólico y se lleva a una forma farmacéutica líquida (colutorio).
- **Indicadores:** Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.
- **Expresión final:** mg/ mL

V. Colutorio elaborado con extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* y *C. parviflora*

Definición conceptual: Preparado líquido formulado a base de la combinación de extractos alcohólicos al 70% de *Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.* a una concentración de 1.28 mg/mL y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy* a una concentración de 2.56 mg/mL, diseñado para uso bucal y evaluación microbiológica (67).

Definición operacional

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón
- **Procedimiento de medición:** Se pesa el extracto alcohólico y se lleva a una forma farmacéutica líquida (colutorio).
- **Indicadores:** Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.
- **Expresión final:** mg/ mL

3.4.1.2. VARIABLES DEPENDIENTES

I. Actividad antibacteriana del extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* sobre *S. mutans* ATCC 25175

Definición conceptual: Capacidad de una sustancia natural de inhibir el crecimiento o destruir cepas bacterianas específicas (66).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
 - **Tipo de medición:** Directa.
 - **Escala de medición:** Razón.
 - **Instrumento de medición:** Microplacas de 96 pocillos y micropipetas
 - **Procedimiento de medición:** Diluciones del extracto en caldo, inoculación con la cepa y determinación de CMI y CMB
 - **Indicadores:** CMI y CMB.
- Expresión final:** ug/mL.

II. Actividad antifúngica del extracto alcohólico al 70% del *C. parviflora* sobre *C. albicans* ATCC 10231

Definición conceptual: Capacidad de una sustancia natural de inhibir el crecimiento o destruir cepas fúngicas específicas (21).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
- **Tipo de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Instrumento de medición:** Microplacas de 96 pocillos y micropipetas
- **Procedimiento de medición:** Inoculación con la cepa y determinación de CMI y CMF (concentración mínima fungicida).
- **Indicadores:** CMI y CMF.
- **Expresión final:** ug/mL.

III. Actividad antibacteriana del colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* sobre *S. mutans* ATCC 25175

Definición conceptual: Capacidad del colutorio formulado a base de extracto alcohólico al 70% de *Geranium ruizii* Hieron. vel sp. aff. para inhibir el crecimiento o eliminar cepas de *Streptococcus mutans* (68).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
- **Tipo de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Instrumento de medición:** Vernier.
- **Procedimiento de medición:** Medición de halos de inhibición en relación de crecimiento bacteriano generado por las diferentes concentraciones del extracto alcohólico.
- **Indicadores:** Diámetro de los halos de inhibición.
- **Expresión final:** mm (diámetro de halos).

IV. Actividad antifúngica del colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora* sobre *C. albicans* ATCC 10231

Definición conceptual: Capacidad del colutorio formulado a base de extracto alcohólico al 70% de *Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy para inhibir el crecimiento o eliminar cepas de *Candida albicans* (68).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
- **Tipo de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Instrumento de medición:** Vernier.
- **Procedimiento de medición:** Medición de halos de inhibición en relación de crecimiento fúngico generado por las diferentes concentraciones del extracto alcohólico.
- **Indicadores:** Diámetro de los halos de inhibición.
- **Expresión final:** mm (diámetro de halos).

V. Actividad antibacteriana y antifúngica del colutorio elaborado con extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* y *C. parviflora*

Definición conceptual: Capacidad del colutorio formulado con la combinación de extractos alcohólicos al 70% de *Geranium ruizii* Hieron. vel sp. aff. y *Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy para inhibir o eliminar cepas bacterianas y fúngicas de interés clínico (68).

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativa.
- **Tipo de medición:** Directa.
- **Escala de medición:** Razón.
- **Instrumento de medición:** Vernier.
- **Procedimiento de medición:** Medición de halos de inhibición en relación de crecimiento bacteriano y fúngico generado por las diferentes concentraciones del extracto alcohólico.
- **Indicadores:** Diámetro de los halos de inhibición.
- **Expresión final:** mm (diámetro de halos).

3.4.2. VARIABLES NO IMPLICADAS

VARIABLES INTERVINIENTES

3.4.2.1. RELACIONADAS CON EL MATERIAL VEGETAL

Para asegurar la reproducibilidad y la concentración de metabolitos secundarios, se estandarizaron los siguientes factores:

- a) **Lugar de procedencia:** Los ejemplares de *Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.* (Chili chili) y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy* (Sacha paraccay) fueron recolectados en el distrito de Ancahuasi, provincia de Anta (Cusco). En el caso del *G. ruizii* se obtuvo a una altitud de 3457 m s. n. m. mientras que *C. parviflora* fue recolectada en la comunidad de San Rafael a 3502 m s. n. m.
- b) **Periodo estacional de recolección:** Ambas especies fueron acopiadas durante el mes de enero del año 2022, periodo que corresponde a la época de lluvias, factor que influye en el estado fenológico y la biosíntesis de principios activos.
- c) **Órganos vegetales seleccionados:** Se utilizó la planta completa (sumidades aéreas y raíz) de *G. ruizii* y exclusivamente el sistema radicular de *C. parviflora*, por ser las partes con mayor reporte de actividad antimicrobiana.

3.4.2.2. RELACIONADAS CON LOS AGENTES MICROBIOLÓGICOS

La estandarización de las condiciones de cultivo garantiza que los halos de inhibición (expresados en mm) dependan únicamente de la acción del colutorio:

- a) **Especificidad de las cepas:** Se trabajó con cepas de referencia certificadas: la bacteria Gram positiva *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y el hongo levaduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231).
- b) **Medios de cultivo y activación:** Para la reactivación y crecimiento óptimo, se empleó Agar Sangre para *S. mutans* (fomentando el desarrollo de bacterias exigentes) y Agar Sabouraud para *C. albicans* (específico para el aislamiento de hongos).

c) Condiciones de incubación:

- *S. mutans*: Incubación a 36 ± 1 °C durante un periodo de 48 horas.
- *C. albicans*: Incubación a 36 ± 1 °C durante un periodo de 72 horas.

3.4.2.3. DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DEL HUEVO PARA LA PRUEBA DE IRRITACIÓN POR HET-CAM

Para la prueba de irritabilidad sobre la membrana corioalantoidea (CAM), se controlaron los siguientes parámetros:

- a) Origen biológico:** Se utilizaron huevos fértiles de gallina de corral (*Gallus gallus*, familia Phasianidae).
- b) Criterios de viabilidad y selección:** Se realizó la técnica de ovoscopia y pruebas de flotación para confirmar la presencia de embriones vivos y descartar unidades infértiles o dañadas.
- c) Cronología de incubación:** El proceso inició entre las 24 y 48 horas post-ovado, manteniéndose en condiciones controladas hasta el décimo día, etapa óptima para la exposición de la membrana corioalantoidea.

3.4.3. IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 7. Operacionalización de variables

	VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADORES	NATURALEZA	TIPO DE MEDICION	ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO DE MEDICION	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
INDEPENDIENTES	Extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili)	El extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> corresponde a la solución obtenida a partir de la raíz y el tallo de la planta, empleando etanol al 70% como solvente. Se obtiene mediante el proceso de maceración y posterior evaporación hasta sequedad (66).	Cantidad de extracto disuelto/ cantidad de solvente.	Cuantitativa	Directa	De razón	Se pesa el extracto seco alcohólico en miligramos luego se realizan las diluciones con los disolventes adecuados. (ml)	Balanza analítica	mg/ mL
	Extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	El extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> se define como la sustancia obtenida a partir de la raíz de la planta, empleando etanol como solvente. Se obtiene por maceración y posterior evaporación hasta sequedad (21).	Cantidad de extracto disuelto/ cantidad de solvente.	Cuantitativa	Directa	De razón	Se pesa el extracto seco alcohólico en miligramos luego se realizan las diluciones con los disolventes adecuados. (ml)	Balanza analítica	mg/ mL
	Colutorio elaborado a base del extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili)	Preparado líquido formulado a base del extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> , diseñado para uso bucal y evaluación microbiológica (67).	-Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. - Prueba de irritabilidad HET-CAM.	Cuantitativa	Directa	De razón	Se pesa el extracto alcohólico y se lleva a una forma farmacéutica líquida (colutorio).	Estufa, tubos, placas de cultivo, incubadora.	mg/ mL

	Colutorio elaborado a base del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Preparado líquido formulado a base del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> , diseñado para uso bucal y evaluación microbiológica (67).	-Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. - Prueba de irritabilidad HET-CAM	Cuantitativa	Directa	De razón	Se pesa el extracto alcohólico y se lleva a una forma farmacéutica líquida (colutorio).	Estufa, tubos, placas de cultivo, incubadora.	mg/ mL
	Colutorio elaborado a base de extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Preparado líquido formulado a base de la combinación de extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> y <i>C. parviflora</i> diseñado para uso bucal y evaluación microbiológica (67).	- Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. - Prueba de irritabilidad HET-CAM	Cuantitativa	Directa	De razón	Se pesan los extractos alcohólico y se lleva a una forma farmacéutica líquida (colutorio).	- Estufa, tubos, placas de cultivo, incubadora	mg/ mL
DEPENDIENTES	Actividad antibacteriana del extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175	Capacidad de una sustancia natural de inhibir el crecimiento o destruir cepas bacterianas específicas (66).	CMI y CMB	Cuantitativa	Directa	De razón	Diluciones del extracto en caldo, inoculación con la cepa y tederminación de CMI y CMB.	-Microplacas de 96 pocillos -Micropipetas	ug/mL
	Actividad antifúngica del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231	Capacidad de una sustancia natural de inhibir el crecimiento o destruir cepas fúngicas específicas (21).	CMI y CMF	Cuantitativa	Directa	De razón	Diluciones del extracto en caldo, inoculación con la cepa y tederminación de CMI y CMF.	-Microplacas de 96Pocillos -Micropipetas	ug/mL

Actividad antibacteriana del colutorio elaborado a base del extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) sobre <i>S. mutans</i> ATCC 25175	Capacidad del colutorio formulado a base de extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> para inhibir el crecimiento o eliminar cepas de <i>Streptococcus mutans</i> (68).	Diámetro de los halos de inhibición.	Cuantitativa	Directa	De razón	Medición de halos de inhibición en relación al crecimiento bacteriano generado por las diferentes concentraciones del extracto alcohólico.	Vernier	mm (diámetro de halos)
Actividad antifúngica del colutorio elaborado a base del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) sobre <i>C. albicans</i> ATCC 10231	Capacidad del colutorio formulado a base de extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> para inhibir el crecimiento o eliminar cepas de <i>Candida albicans</i> (68).	Diámetro de los halos de inhibición	Cuantitativa	Directa	De razón	Medición de halos de inhibición en relación al crecimiento fúngico generado por las diferentes concentraciones del extracto alcohólico.	Vernier	mm (diámetro de halos)
Actividad antibacteriana y antifúngica del colutorio elaborado a base de extracto alcohólico al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Capacidad del colutorio formulado con la combinación de extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> y <i>C. parviflora</i> para inhibir o eliminar cepas bacterianas y fúngicas de interés clínico (68).	Diámetro de los halos de inhibición.	Cuantitativa	Directa	De razón	Medición de halos de inhibición en relación al crecimiento bacteriano y fúngico generado por las diferentes concentraciones del extracto alcohólico.	Vernier	mm (diámetro de halos)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8. Operacionalización de variable no intervinientes

VARIABLES NO INTERVINIENTES		NATURALEZA	FORMA DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL
Características de las especies vegetales	Chili chili (<i>Geranium ruizii</i> <i>Hieron. vel sp. aff.</i>)	Cualitativa	Directa	Nominal	Especie vegetal en buen estado.
Lugar de crecimiento Temporada de recolección Horario de recolección Altitud de recolección Partes de la planta a estudiar	Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora</i> (Kunth) Choisy)	Cualitativa	Directa	Nominal	Raíz en buenas condiciones.
Características de las cepa en estudio	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 27175	Cualitativa	Directa	Nominal	Cepas estándar de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 27175
Tipo de cepa Medio de cultivo Tiempo y temperatura de incubación	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Cualitativa	Directa	Nominal	Cepas estándar de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Características de los huevos para la prueba HET-CAM	Tiempo de incubación	Cuantitativa	Directa	Nominal	Huevos en perfecto estado libre de daños evidentes.
	Viabilidad de huevos fértiles	Cualitativa	Directa	Nominal	
	Raza de la gallina	Cualitativa	Directa	Nominal	

Fuente: Elaboración propia

3.5. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

3.5.1. DE LA MUESTRA VEGETAL

INCLUSIÓN:

- Ejemplares de *Geranium ruizii* (Chili chili) que presenten tallos, hojas y raíces en óptimo estado de conservación, libres de plagas o daños mecánicos.
- Raíces de *Colignonia parviflora* (Sacha paraccay) que muestren integridad física, y madurez adecuada.

EXCLUSIÓN:

- Órganos vegetales de *G. ruizii* que presenten necrosis, marchitamiento, presencia de hongos o cualquier tipo de deterioro evidente.
- Raíces de *C. parviflora* que se encuentren dañadas, contaminadas, con signos de descomposición o aquellas que no hayan alcanzado un proceso de desecación uniforme.

3.5.2. DE LAS CEPAS MICROBIANAS

INCLUSIÓN:

- Cepas certificadas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Candida albicans* (ATCC 10231), debidamente autenticadas por el laboratorio Genlab S.A.C.
- Cultivos microbiológicos que presenten viabilidad confirmada y pureza, mantenidos bajo condiciones estandarizadas de temperatura y humedad.

EXCLUSIÓN:

- Cepas que muestren signos de contaminación cruzada o polimicrobiana.
- Cultivos con pérdida de viabilidad o que no cumplan con las características fenotípicas propias de la especie certificada.

3.5.3. DE LOS HUEVOS EMBRIONADOS PARA LA PRUEBA HET-CAM

INCLUSIÓN:

- Huevos de gallina (*Gallus gallus*) fértiles y frescos, con un peso y tamaño estandarizado.
- Embriones con un periodo de incubación exacto de 10 días, que presenten una red vascular corioalantoidea claramente visible y activa.

EXCLUSIÓN:

- Huevos inviables (no fértiles) o que no hayan logrado el desarrollo de la membrana corioalantoidea al décimo día.
- Unidades que presenten fisuras en el cascarón, malformaciones embrionarias o dimensiones significativamente menores al estándar promedio.

3.6. PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.6.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE CHILI CHILI (*G. ruizii*) Y SACHA PARACCAY (*C. parviflora*)

a) RECOLECCIÓN DE LAS ESPECIES VEGETALES

Las muestras botánicas de *Geranium ruizii* (Chili chili) y *Colignonia parviflora* (Sacha paraccay) fueron recolectadas en el distrito de Ancahuasi, provincia de Anta, departamento del Cusco. El punto de muestreo se localizó a una altitud de 3457 m s. n. m. para la primera especie y 3502 m s. n. m. para la segunda. La recolección se realizó considerando el estado fenológico de las plantas para asegurar la presencia de los metabolitos secundarios de interés.

b) SELECCIÓN Y SECADO DE LAS MUESTRAS

Tras la obtención del material biológico, se procedió a la selección manual, descartando elementos extraños y especímenes dañados para garantizar la pureza de la muestra. Posteriormente, los órganos vegetales fueron sometidos a un proceso de desecación por aireación natural. Este procedimiento se llevó a cabo en un ambiente controlado, caracterizado por ser fresco, seco y ventilado,

evitando la exposición directa a la radiación solar para prevenir la fotodegradación de los principios activos termosensibles. El proceso concluyó una vez que las muestras alcanzaron un peso constante y una textura apta para la molienda.

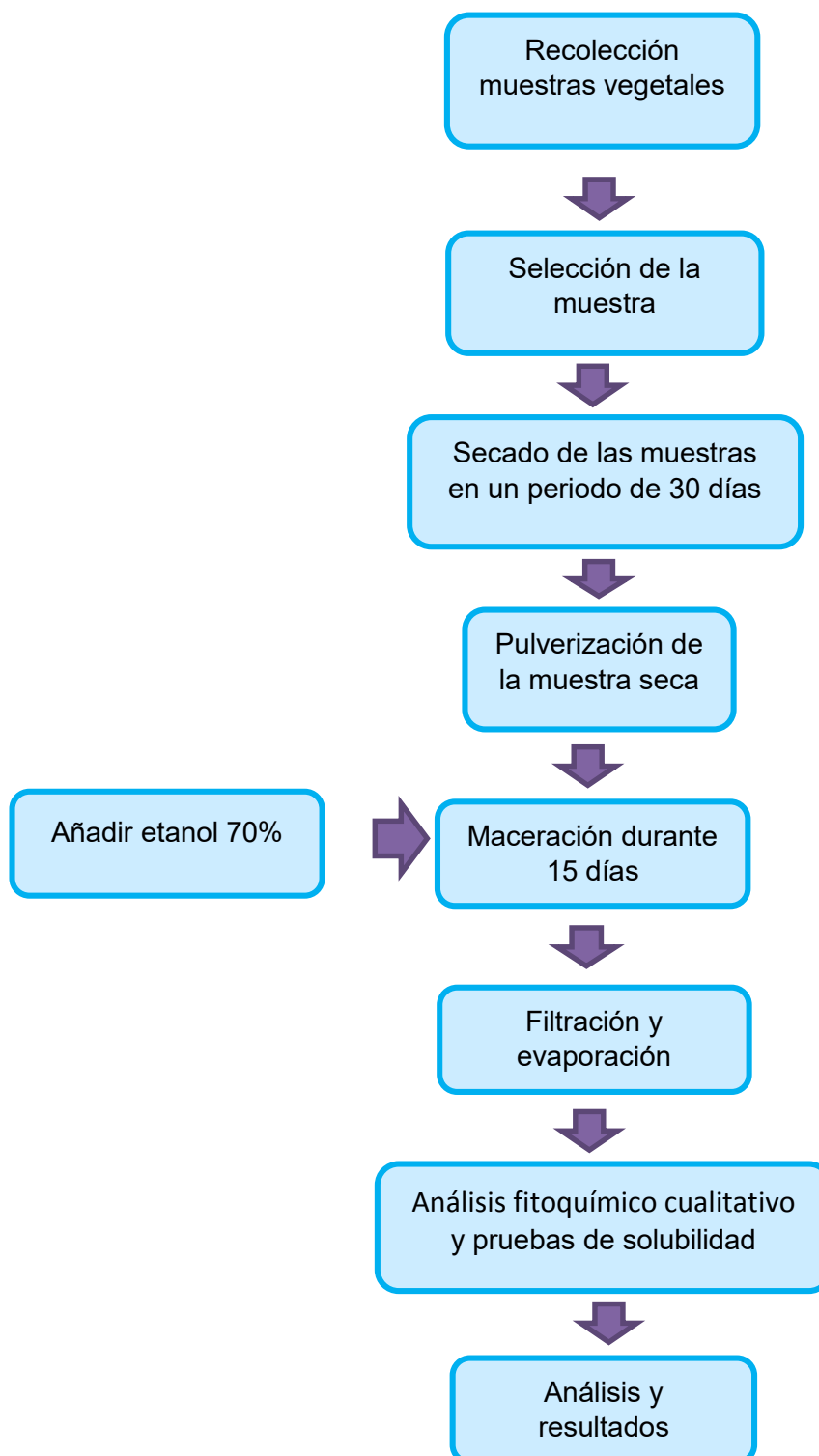
c) MOLIENDA DE LAS MUESTRAS

Posterior al secado, se procedió con la molienda de las especies botánicas. Se obtuvieron 200 mg de la planta entera de Chili chili (*G. ruizii*) mediante trituración en mortero. Por otro lado, la raíz de Sacha paraccay (*C. parviflora*) fue sometida a una molienda mecánica manual seguida de una pulverización en mortero, recolectándose 100 mg de muestra. Con el fin de preservar la integridad de los metabolitos, los polvos fueron resguardados en envases de color ámbar con tapa hermética.

d) OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

Las muestras pulverizadas se depositaron en frascos de vidrio ámbar, empleando alcohol etílico al 70% como solvente de extracción. El proceso de maceración dinámica se llevó a cabo durante un periodo de 15 días, con agitación manual diaria para favorecer la transferencia de masa. Cumplido este tiempo, el macerado fue filtrado y vertido en vasos de precipitados para su concentración. La evaporación del solvente se realizó mediante baño María a una temperatura controlada de 40°C a 45°C, siguiendo los criterios de estabilidad térmica para metabolitos secundarios (73). Este procedimiento se mantuvo hasta la obtención de un extracto blando (consistencia de melaza) de las especies *Geranium ruizii* y *Colignonia parviflora*, el cual fue rotulado y refrigerado para su posterior uso en la formulación del colutorio.

Flujograma 1. Obtención del extracto alcohólico al 70% de Chili chili (*Geranium ruizii* Hieron. vel sp. aff.) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy)



Fuente: Elaboración propia

3.6.2. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Se pesaron 100 mg de los extractos alcohólicos al 70% de ambas especies vegetales y se colocaron en tubos de ensayo. Posteriormente se añadieron entre 1 y 3 ml de disolventes los cuales fueron aplicados en orden decreciente de polaridad: agua, metanol, etanol 40 %, etanol 70 %, etanol 96 %, acetona, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico, bencina y hexano (16).

3.6.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

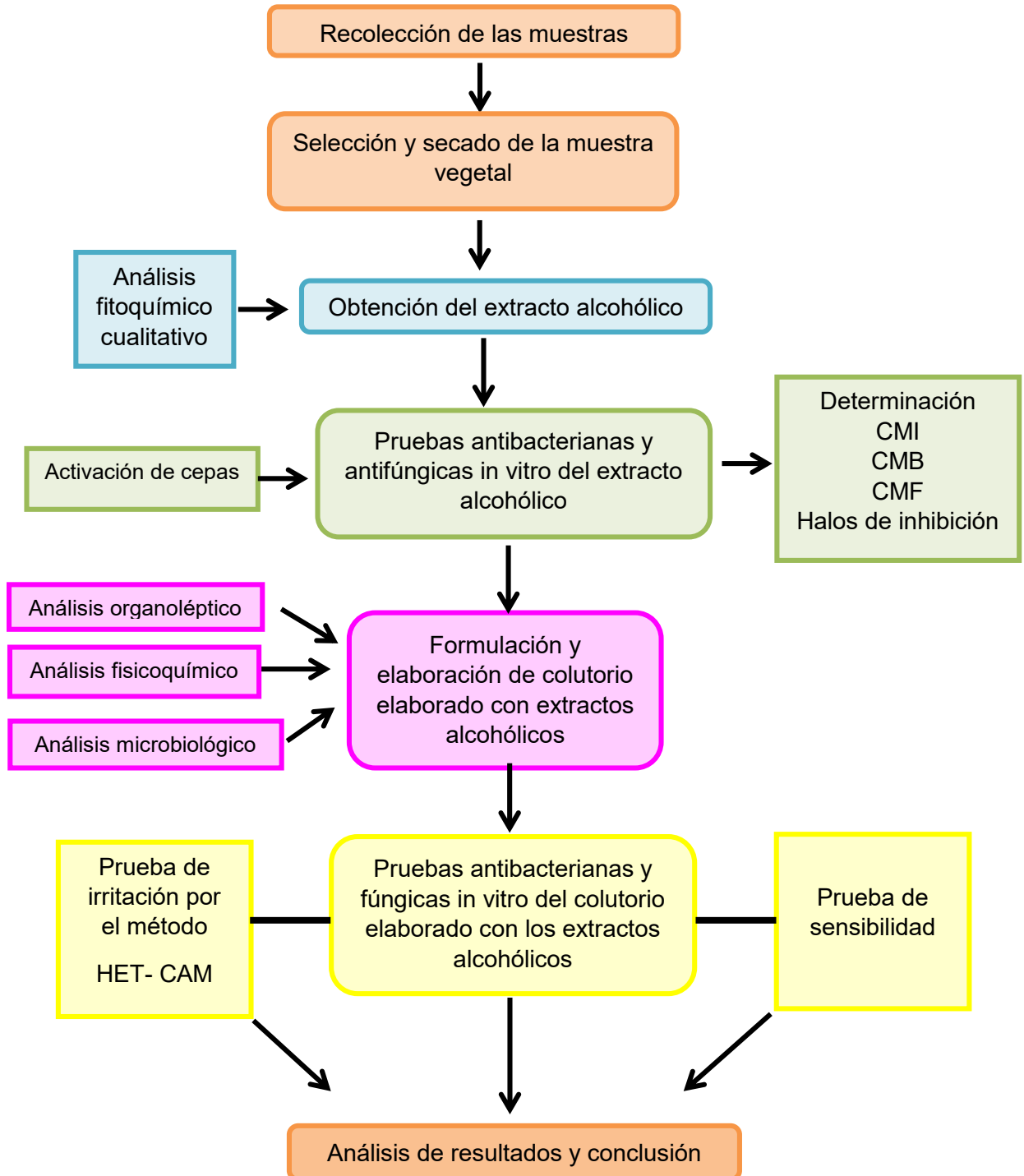
Los extractos alcohólicos de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) fueron analizados para la identificación de metabolitos secundarios.

METABOLITOS SECUNDARIOS	ENSAYOS
Alcaloides	Dragendorff
Azucres reductores	Feling AyB
Saponinas	Espuma
Flavonoides	Reacción de Shinoda
Quinonas	Bontrager
Taninos	Gelatina
Aminoácidos	Ninhidrina

Tabla 9. Análisis fitoquímico cualitativo
Fuente: Lock de Ugaz O. Investigación fitoquímica. 1994. (69)

3.6.4. PROCEDIMIENTO GENERAL DEL ESTUDIO

Flujograma 2. Procedimiento general del estudio



Fuente: Elaboración propia

3.6.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO al 70% DE *G. ruizii* (Chili chili) Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO *C. parviflora* (Sacha paraccay)

3.6.5.1. ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

- **ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS *Streptococcus mutans* ATCC 27175**

El proceso de activación se inició a partir de un inóculo liofilizado en dispositivo KWIK-STIK. Se procedió a la ruptura de la ampolla interna para liberar el líquido rehidratante sobre el sedimento bacteriano, logrando una suspensión homogénea. Posteriormente, se realizó la siembra por el método de extensión superficial en placas de Agar Sangre. Con el fin de simular las condiciones del nicho ecológico oral, las placas se incubaron en una jarra de anaerobiosis a una temperatura de 36 ± 1 °C por un lapso de 48 horas, facilitando así el aislamiento y desarrollo colonial(70).

- **ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS *Candida albicans* ATCC 10231**

Para la cepa fúngica, se utilizó un protocolo de estabilización térmica a temperatura ambiente por 20 minutos previo a su manipulación. La siembra se ejecutó en medio Agar Sabouraud Dextrosa (SDA) mediante la técnica de estriado por agotamiento. Finalmente, se incubaron las placas a 36 ± 1 °C durante un periodo de 72 horas para verificar la viabilidad y pureza del cultivo (71).

3.6.5.2. MANTENIMIENTO Y PRESERVACIÓN

La conservación a corto plazo se realizó en tubos con Agar Tripticasa de Soya (TSA) dispuestos en plano inclinado (pico de flauta). Tras la inoculación y una fase de incubación de 48 a 72 horas a 37 °C, los viales se rotularon y almacenaron en condiciones de refrigeración a 4 °C. Para asegurar la estabilidad fenotípica, se programaron subcultivos sistemáticos cada 15 días en medio fresco (70) (71).

3.6.5.3. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Rigor Experimental: Es fundamental precisar que la totalidad de los ensayos descritos a continuación se ejecutaron de forma independiente y por triplicado, con el objetivo de minimizar el error experimental y asegurar la validez estadística de los hallazgos.

A. ENSAYO PRELIMINAR DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se efectuó un ensayo de cribado inicial empleando la técnica de excavación de pozos (cup-plate) en placas de agar. Se evaluaron 15 concentraciones crecientes (Tabla 11), depositando un volumen de 50 µL en cada cavidad. Este procedimiento permitió delimitar el rango de actividad biológica y establecer las concentraciones base para las pruebas cuantitativas posteriores (16).

Concentraciones	
C1	0.025mg/50uL
C2	0.05mg/50UI
C3	0.5mg/50uL
C4	0.755mg/50uL
C5	1mg/50uL
C6	1.5mg/50uL
C7	2mg/50uL
C8	3mg/50uL
C9	5mg/50uL
C10	10mg/50uL
C11	20mg/50uL
C12	40mg/50uL
C13	60mg/50uL
C14	80mg/50uL
C15	100mg/50uL

Tabla 10. Concentraciones preliminares para sensibilidad antimicrobiana
Fuente: Wiegand C, Hilpert K, Hancock REW (72)

Cada pozo presentó una capacidad de 50 uL para la determinación de la concentración inhibitoria mínima del Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) (16).

B. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS al 70% DE *G. ruizii* Y *C. parviflora* SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 27175 Y *Candida albicans* ATCC 10231

Se aplicó el estándar de microdilución en caldo en placas de 96 pocillos, conforme a lo descrito por Wiegand et al. (72). Se dosificaron 50 µL del extracto alcohólico (solubilizado en caldo Mueller-Hinton) y se inocularon con 50 µL de la suspensión microbiana estandarizada. Tras una incubación de 18 a 20 horas a 37 °C, se adicionó el revelador metabólico cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) a una concentración de 0.2 mg/mL. La ausencia de viraje de color (permanencia incolora) se interpretó como inhibición efectiva del crecimiento. Se incluyeron como controles de referencia la Amoxicilina y la Nistatina, ambas a 64 mg/L. (72).

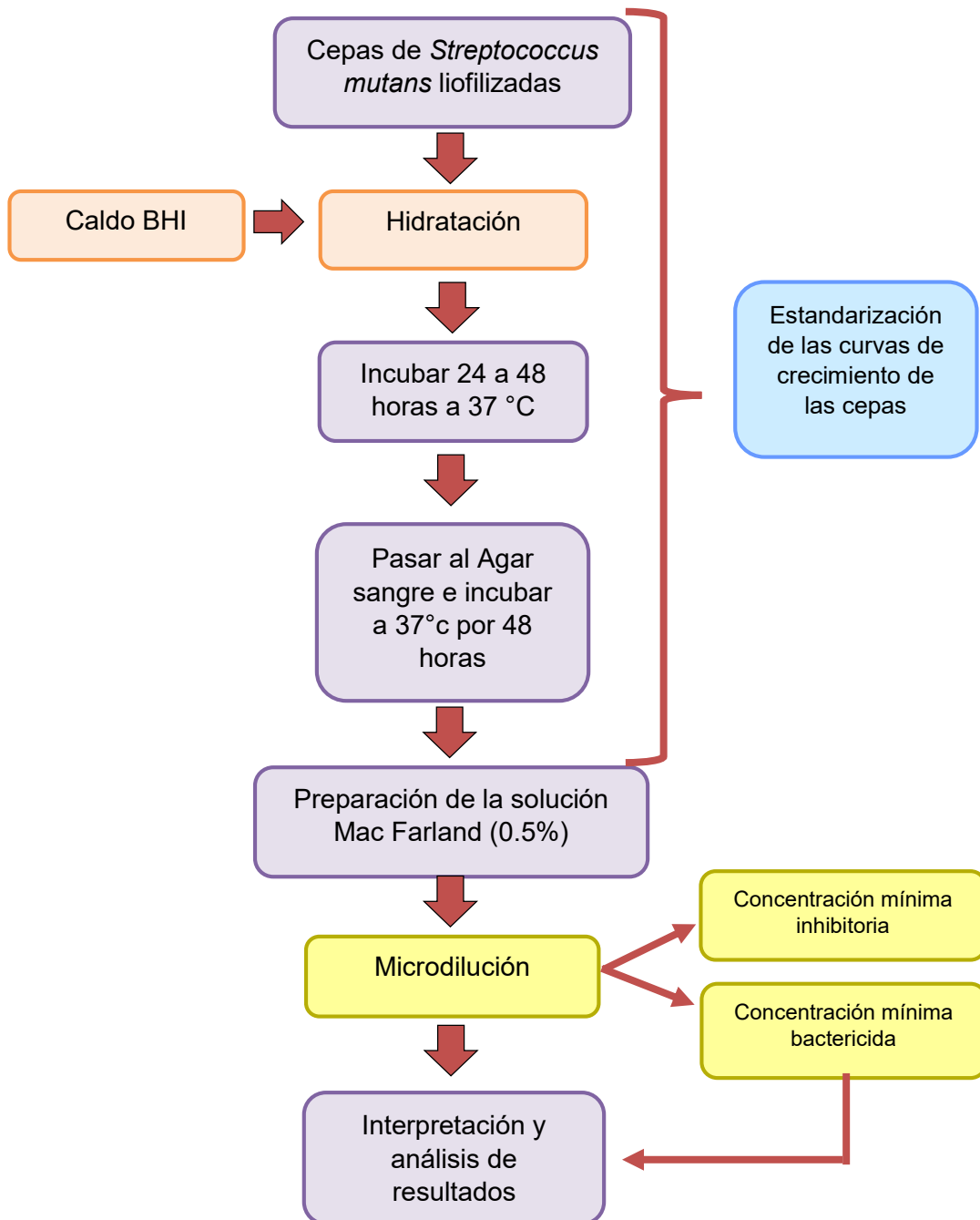
C. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA Y FUNGICIDA DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS al 70% DE *G. ruizii* Y *C. parviflora* SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 27175 Y *Candida albicans* ATCC 10231

Para discernir entre el efecto bacteriostático y bactericida, se realizaron subcultivos en Agar Mueller-Hinton a partir de los pocillos que no exhibieron desarrollo visible en la prueba de CMI. Tras 24 horas de incubación a 37 °C, la CMB y CMF se definieron como la concentración más baja capaz de eliminar el 99.9% del inóculo inicial, evidenciada por la ausencia total de unidades formadoras de colonias (72).

D. MÉTODO DE DIFUSIÓN CON DISCOS DE PAPEL

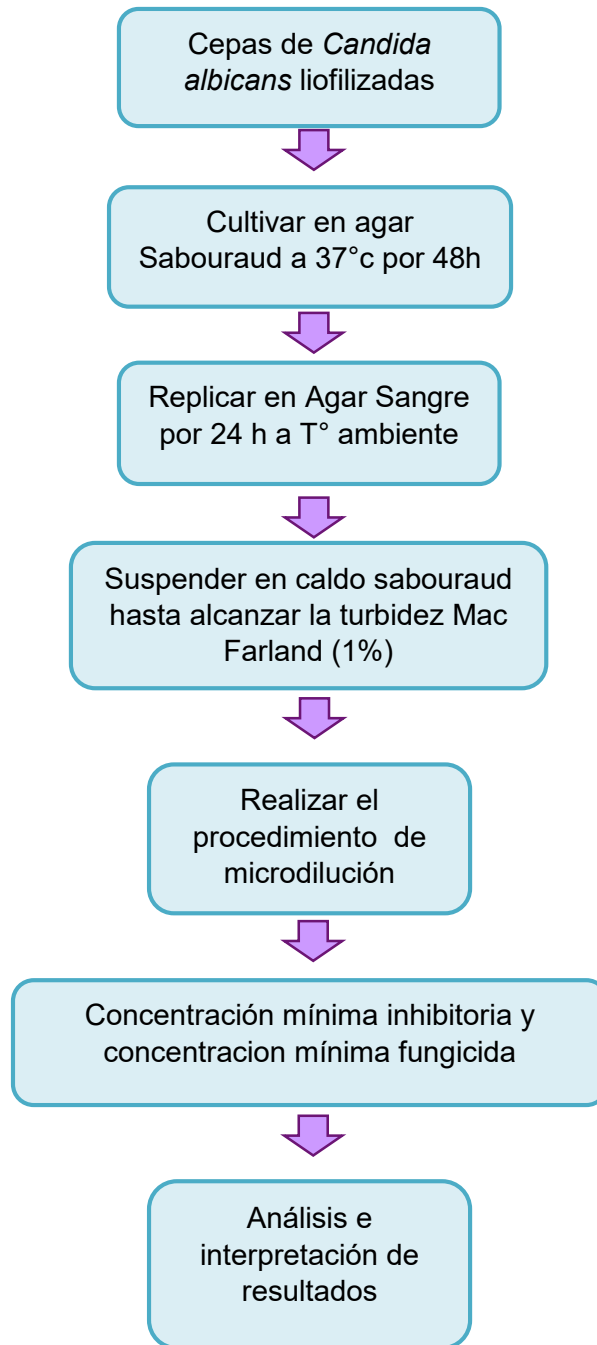
Complementariamente, se evaluó el diámetro de los halos de inhibición. Se inoculó la superficie del agar Mueller-Hinton de manera uniforme y se dispusieron discos de papel filtro cargados con concentraciones de 12 a 128 µg/mL de los extractos. Los resultados se cuantificaron en milímetros tras 18 horas de incubación, comparando la eficacia de los extractos vegetales frente a los fármacos convencionales (72).

Flujograma 3. Actividad antibacteriana del extracto alcohólico al 70% de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*)



Fuente: Wiegand. Food science. 2019 (72)

Flujograma 4. Actividad antifúngica del extracto alcohólico al 70% del Sacha paraccay (*Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy)



Fuente: Zapata Miranda, Eulogio. 2017 (73)

3.6.6. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO

Teniendo en cuenta CMI (concentración mínima inhibitoria) de los extractos alcohólicos se procedió con la formulación del colutorio. Los excipientes usados fueron: elementos humectantes (sorbitol, glicerina), saborizante (menta), tensioactivo (lauril éter sulfato de sodio), edulcorante (sacarina sódica), colorante (verde menta) y por último al principio activo (el extracto alcohólico de las especies vegetales).

3.6.6.1. Fórmula unitaria colutorio A: Colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* (Chili chili)

Tabla 11. Fórmula unitaria colutorio A: Colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* (Chili chili)

FÓRMULA UNITARIA COLUTORIO A	
Sustancia	Porcentaje (%)
Lauril eter sulfato de sodio	3.75
Glicerina	18.40
Sorbitol 70%	1.50
Sacarina sodica	0.04
Sabor menta	2.25
Extracto alcohólico de Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	2.50
Agua	72.00
Total	100%

Fuente: Aulton M, Taylor K. Pharmaceutics. 2018. (49); Moína Gallegos, Víctor. 2015

3.6.6.2. Fórmula unitaria colutorio B: colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora* (Sacha paraccay)

Tabla 12. Fórmula unitaria colutorio B: colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora* (Sacha paraccay)

FÓRMULA UNITARIA COLUTORIO B	
Sustancia	Porcentaje (%)
Lauril eter sulfato de sodio	3.75
Glicerina	18.40
Sorbitol 70%	1.50
Sacarina sodica	0.04
Sabor menta	2.25
Extracto alcohólico de Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)	2.50
Agua	72.00
Total	100%

Fuente: Aulton M, Taylor K. Pharmaceutics. 2018. (49); Moína Gallegos, Víctor. 2015

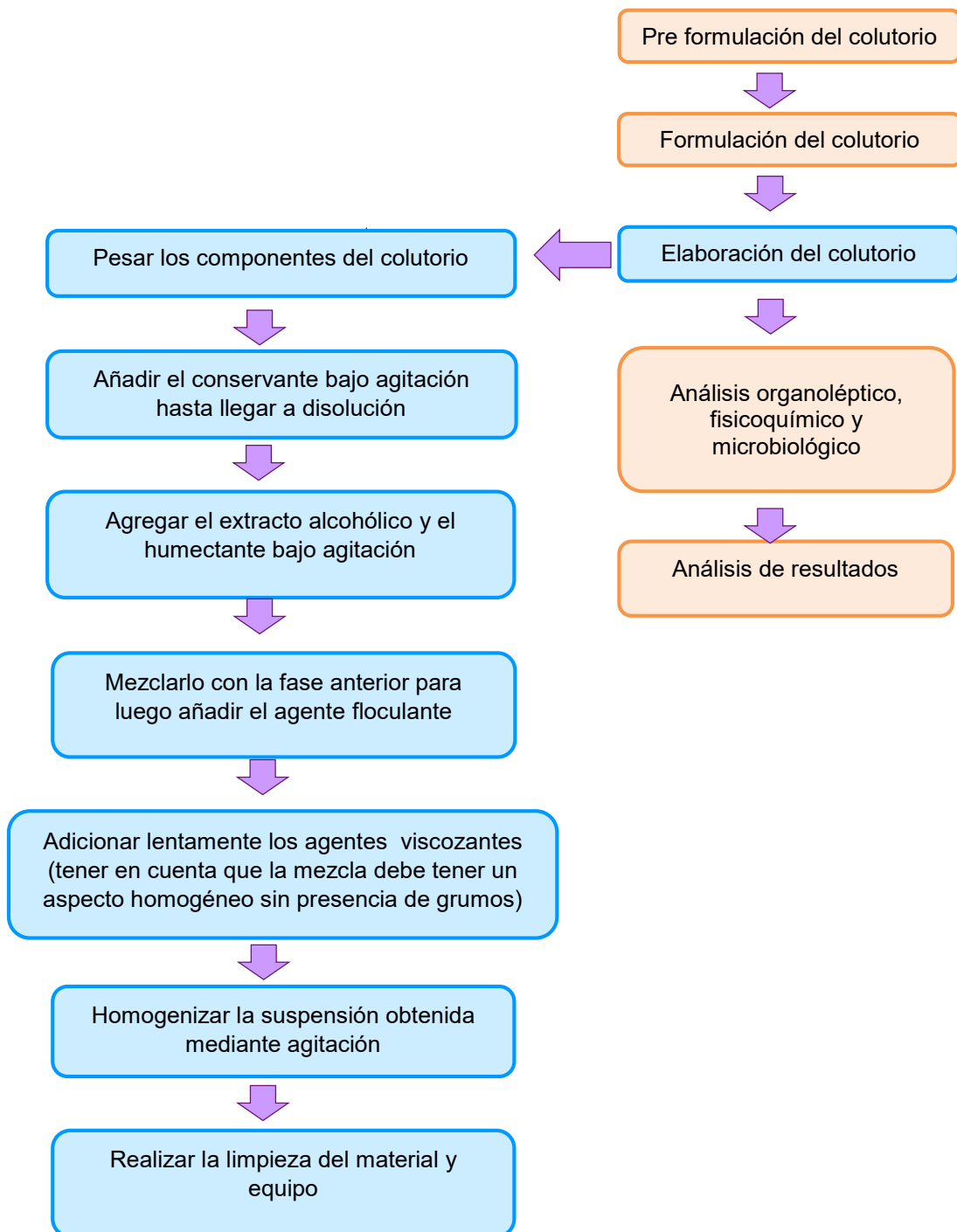
3.6.6.3. Fórmula unitaria colutorio C: colutorio elaborado con el 50% del extracto alcohólico de *G. ruizii* (Chili chili) y el 50% del extracto alcohólico de *C. parviflora* (Sacha paraccay)

Tabla 13. Fórmula unitaria colutorio C: colutorio elaborado con 50% del extracto alcohólico de *G. ruizii* (Chili chili) y 50% del extracto alcohólico de *C. parviflora* (Sacha paraccay)

FÓRMULA UNITARIA COLUTORIO C	
Sustancia	Porcentaje (%)
Lauril eter sulfato de sodio	3.75
Glicerina	18.40
Sorbitol 70%	1.50
Sacarina sodica	0.04
Sabor menta	2.25
Extracto alcohólico de Sacha Paraccay (<i>C. parviflora</i>)	1.25
Extracto alcohólico de Chili Chili (<i>G. ruizii</i>)	1.25
Agua	72.00
Total	100%

Fuente: Aulton M, Taylor K. Pharmaceutics. 2018. (49); Moina Gallegos, Víctor. 2015 (68)

Flujograma 5. Formulación y elaboración del colutorio

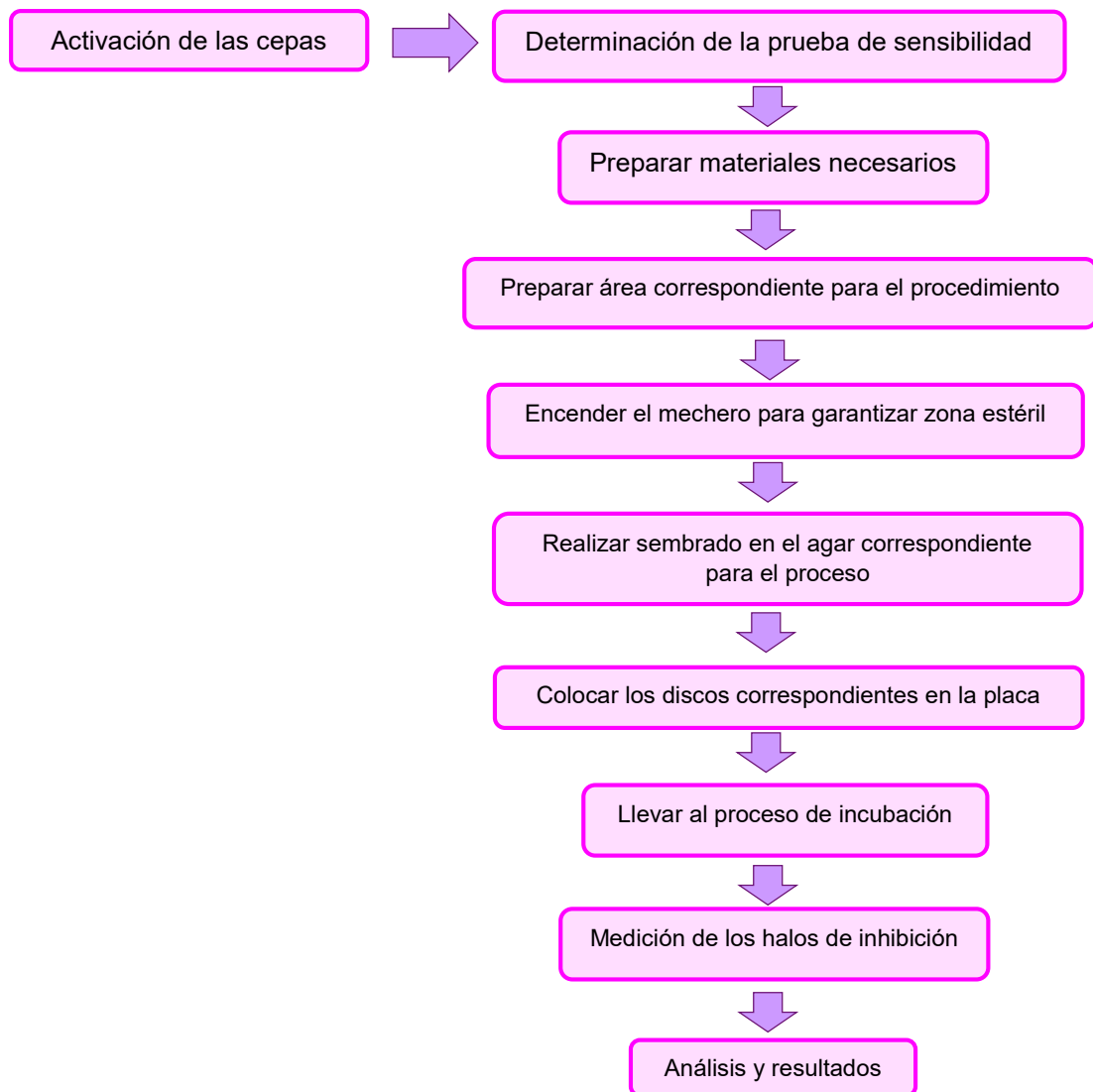


Fuente: Caceres Pedraza, Ines. 2013 (74)

3.6.7. PRUEBA DE SENSIBILIDAD DE LOS COLUTORIO ELABORADOS

- Se prepararon placas de agar Muller – Hinton con cepas de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*.
- Se colocaron discos de papel filtro con los colutorios elaborados con una pinza estéril a una distancia de más de 15 mm alrededor de la placa y fue distribuido de forma de que no estén superpuestos los halos de inhibición.
- Una vez que fueron colocados los discos con el principio activo y los colutorios en las placas se incubaron de 35°C a 37°C durante 24 horas a 48 horas.
- Pasado el tiempo se procedió a medir los halos con vernier y anotar los resultados (75).

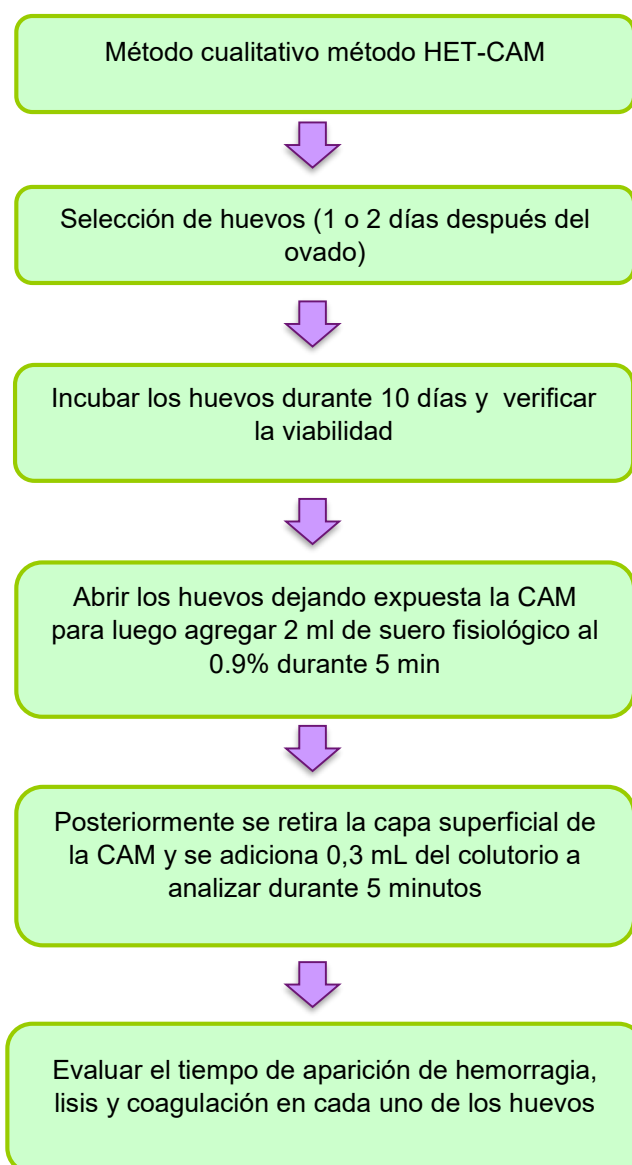
Flujograma 6. Prueba de sensibilidad de los colutorios elaborados



Fuente: Jauregui Zela, Sarah. 2018. (21)

3.6.8. PRUEBA DE IRRITACIÓN POR EL MÉTODO HET-CAM

Flujograma 7. Prueba de irritación por el método HET – CAM (Membrana corioalantoidea)



Fuente: Manyari Pérez Lizeth Judith, Suárez Becerra Ronal Elgar (76)

3.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.7.1. TÉCNICA

El presente trabajo se realizó mediante una observación experimental, por lo tanto, se hizo uso de cámaras fotográficas y fichas de colección de datos.

3.7.2. INSTRUMENTOS

- Ficha de recolección y secado de la muestra vegetal (Anexo1)
- Ficha de determinación de porcentaje de humedad (Anexo2)
- Ficha de pruebas de solubilidad (Anexo3)
- Ficha de análisis fotoquímico cualitativo (Anexo4)
- Ficha de recolección de datos de los halos de inhibición del extracto alcohólico (Anexo5)
- Ficha de recolección de datos de los halos del colutorio elaborado con el extracto alcohólico y colutorios comerciales. (Anexo 6)
- Ficha de prueba de irritación por el método HET-CAM (Anexo7)

3.8. TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

El análisis de datos obtenidos se realizó en el paquete estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 28.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- **Anova:** El valor de la varianza será utilizado para el análisis del estudio con el objetivo de estimar y comprobar hipótesis con respecto a las medias de la muestra o población donde las conclusiones en relación a las medias dependerán del valor de las varianzas obtenidas (77).
- **Kruskal-Wallis:** Es un estadístico no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población además de usarse para varias muestras independientes (78).
- **Post-Hoc DUNN:** Un procedimiento estadístico que se utiliza para comparar múltiples pares de medias (promedios) en un grupo de datos (78).

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS al 70% DE CHILI CHILI (*Geranium ruizii* Hieron. vel sp. aff.) y SACHA PARACCAY (*Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy)

4.1.1. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Los resultados obtenidos del porcentaje de humedad de los extractos etanólicos de Chili chili (*G. ruizii*) y Sacha paraccay (*C. parviflora*) son:

Tabla 14. Porcentaje de humedad de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

ESPECIE	PESO DE MUESTRA FRESCA	PESO DE MUESTRA SECA	PORCENTAJE DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
Chili chili <i>(G. ruizii)</i>	5.057	1.290	74.490	76.32
	5.889	1.346	77.144	
	5.575	1.265	77.310	
Sacha paraccay <i>(C. parviflora)</i>	5.119	1.087	78.765	74.33
	5.282	1.040	80.310	
	5.833	2.105	63.912	

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla N.º 14 se presentan los resultados obtenidos del análisis de humedad de las especies vegetales utilizadas en el presente estudio. El porcentaje promedio de humedad del *Geranium ruizii* Hieron. vel sp. aff. (Chili chili) fue de 76.32%, mientras que el de *Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy (Sacha paraccay) fue de 74.33%. Estos valores indican un alto contenido de agua en ambas especies y adquieren relevancia para su posterior procesamiento y conservación.

Al comparar estos resultados con los hallazgos de Huamán Yeni et al. (2016), quienes reportaron un 54.16% de humedad en *Geranium sessiliflorum* (Ojotillo), se observa una diferencia significativa respecto al valor obtenido para *Geranium*

ruizii Hieron. vel sp. aff.. Esta variación podría atribuirse a factores como la especie vegetal en sí misma, las condiciones edafoclimáticas, el momento de recolección y, principalmente, la ubicación geográfica, ya que ambas especies pertenecen al mismo género, pero fueron recolectadas en lugares distintas (16).

En cuanto a *Sacha paraccay*, Jauregui Sarah (2018) reportó un 84.30% de humedad en la raíz tuberosa de esta misma especie en su estudio sobre actividad antimicótica. A pesar de haberse utilizado la misma especie vegetal, la diferencia en los valores obtenidos puede explicarse por la altitud y microclima de las zonas de recolección, lo que influye directamente en la retención de agua de las plantas. En el presente estudio, la raíz de *Sacha paraccay* presentó un menor contenido de humedad (74.33%), posiblemente asociado a una mayor exposición solar o menor humedad ambiental durante la cosecha (21).

Estos resultados son importantes ya que un elevado contenido de humedad en las plantas frescas puede afectar la estabilidad del extracto si no se realiza un secado adecuado. Además, influye en el rendimiento final del extracto y en la concentración de metabolitos secundarios, los cuales son responsables de la actividad antimicrobiana.

4.1.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Tabla 15. Porcentaje de rendimiento de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (*Sacha paraccay*)

MUESTRA VEGETAL		PESOS			Porcentaje promedio de rendimiento
		Pi: Peso inicial (muestra molida)	Pf: Peso final (extracto seco)	%R (Porcentaje de rendimiento)	
<i>G. ruizii</i> (Chili chili)	1	200	42.32	21.16 %	21.17%
	2	200	42.80	21.40%	
	3	200	41.89	20.95%	
<i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	1	100	14.02	14.2 %	14.60 %
	2	100	15.11	15.11%	
	3	100	14.50	14.5 %	

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla N.º 15 se presentan los resultados del porcentaje de rendimiento del extracto seco obtenido a partir de la maceración con etanol al 70% de las especies vegetales estudiadas. El *G. ruizii* (Chili chili) mostró un rendimiento promedio del 21.17%, mientras que *C. parviflora* (Sacha paraccay) alcanzó un rendimiento promedio del 14.60%.

El rendimiento del extracto de *G. ruizii* es consistente con lo reportado por Huamán Yeni et al. (2016), quienes obtuvieron un 24.16% de extracción utilizando el mismo tipo de solvente. Esta similitud sugiere una eficiencia aceptable del proceso de maceración empleado en el presente estudio. Las ligeras diferencias pueden atribuirse a factores como la madurez del material vegetal, las condiciones ambientales durante la recolección, el tiempo de secado, o incluso la granulometría de la muestra molida (16).

En cuanto a *C. parviflora* el rendimiento obtenido (14.60%) es inferior al reportado por Jáuregui Sarah (2018), quien obtuvo un 19.20% también empleando etanol al 70% como solvente de extracción. Esta variación podría explicarse por múltiples factores, como las condiciones de secado del material vegetal, la forma y tiempo de almacenamiento, la proporción de raíz utilizada, o incluso la altitud del lugar de origen, ya que estos aspectos influyen directamente en la concentración de metabolitos y la eficiencia de extracción (21).

Desde el punto de vista farmacognóstico, un mayor rendimiento de extracción puede estar relacionado con un mayor contenido de principios activos solubles, aunque no necesariamente implica mayor actividad biológica. Sin embargo, los valores obtenidos en ambas especies son adecuados para garantizar la disponibilidad suficiente de extracto seco para la formulación de colutorios y su posterior evaluación microbiológica.

4.2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE LOS COMPONENTES DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS: MARCHA FITOQUÍMICA

Se realizaron pruebas de reacciones químicas cualitativas de los extractos alcohólicos de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) con el objetivo de la determinación de los metabolitos correspondientes.

Tabla 16. Análisis fitoquímico cualitativo del extracto de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) al 70%

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVOS	RESULTADOS	
		<i>G. ruizii</i> (Chili chili)	<i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)
Flavonoides	Reacción de Shinoda	++	-
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico 1%	+++	-
Taninos	Cloruro férrico 1%	++	++
Quinonas	Reacción de Borntrager	+	-
Glicósidos	Reacción de Molish	++	++
Azúcares reductores	Fehling A Fehling B		++
Lactonas	Reacción de Baljet	-	+
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	-	+
Aminoácidos	Reacción Ninhidrina		+
Triterpenos y esteroides	Reacción de Liebermann-Burchad	+	++
Saponinas	Prueba de espuma	-	+++

Fuente: Datos experimentales del estudio

Leyenda:

+++ : Muy abundante

++ : Abundante

+ : Poco abundante

- : Ausencia

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla N.º 16 se presentan los resultados del análisis fitoquímico cualitativo realizado a los extractos etanólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay). Ambos extractos demostraron la presencia de metabolitos secundarios relevantes para la actividad biológica, con variaciones en tipo y concentración.

El extracto de *G. ruizii* mostró una presencia muy abundante de compuestos fenólicos (+++), abundante cantidad de flavonoides, taninos y glicósidos (++), y menor presencia de quinonas y triterpenos/esteroides (+). No se detectó la presencia de alcaloides, saponinas ni lactonas. Estos resultados coinciden en parte con el estudio de Huamán Yeni (2016), quien identificó en *Geranium sessiliflorum* la presencia predominante de compuestos fenólicos, taninos, glicósidos y flavonoides, lo que sugiere cierta similitud fitoquímica entre especies del mismo género, aunque con variaciones atribuibles a diferencias botánicas y ecológicas (16).

Por otro lado, el extracto de *C. parviflora* presentó una presencia muy abundante de saponinas (+++), abundante cantidad de glicósidos, taninos, azúcares reductores y triterpenos/esteroides (++), y leve presencia de lactonas, alcaloides y aminoácidos (+). No se detectaron flavonoides, compuestos fenólicos ni quinonas. Estos resultados concuerdan en gran medida con los hallazgos de Jáuregui Sarah (2018), quien reportó la presencia dominante de saponinas, esteroides, taninos y glicósidos en esta especie, reforzando la consistencia de los perfiles fitoquímicos observados (21).

Los metabolitos identificados en ambos extractos explican, en gran parte, la actividad antibacteriana y antifúngica observada en el estudio. En *G. ruizii*, la alta presencia de compuestos fenólicos, taninos y flavonoides justifica su eficacia frente a *Streptococcus mutans*, mientras que en *C. parviflora*, la presencia predominante de saponinas, taninos y glicósidos podría estar relacionada con su efecto frente a *Candida albicans*.

Esta riqueza fitoquímica respalda el uso tradicional de ambas especies y valida su potencial como base para la formulación de colutorios con actividad antimicrobiana.

4.2.1. ENSAYOS PRELIMINARES

DETERMINACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Tabla 17. Prueba de solubilidad de los extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

SOLVENTE	EXTRACTO ALCOHÓLICO	
	Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)
Agua	++	+++
Metanol	+++	-
Etanol 40°	++	++
Etanol 70°	+++	+++
Etanol 96°	++	++
Acetato de etilo	-	-
Acetona	+	-
Cloroformo	+	-
Éter etílico	-	-
Bencina	++	++
Hexano	+	-

Fuente: Datos experimentales del estudio

Leyenda:

+++ : Muy soluble

++ : Soluble

+ : Poco soluble

- : Insoluble

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La Tabla N.º 17 presenta los resultados de la prueba de solubilidad de los extractos etanólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a distintos solventes orgánicos y polares. Este análisis permite identificar la afinidad de los metabolitos secundarios presentes en cada extracto con los diferentes disolventes, lo cual es fundamental para procesos de formulación, purificación y estudios farmacognósticos.

El extracto de *G. ruizii* mostró muy buena solubilidad en metanol y etanol al 70% (+++), y buena solubilidad (++) en agua, etanol al 40%, etanol al 96% y bencina.

Fue poco soluble (+) en acetona, cloroformo y hexano, y totalmente insoluble (-) en acetato de etilo y éter etílico. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Huamán et al. (2016), quienes también reportaron una alta solubilidad en disolventes polares, especialmente metanol y etanol 70%, lo cual es consistente con la presencia predominante de compuestos fenólicos, flavonoides y glicósidos, conocidos por su afinidad con solventes polares (16).

Por su parte, el extracto de *C. parviflora* presentó muy buena solubilidad en agua y etanol 70% (+++), y fue soluble en etanol 40%, etanol 96% y bencina (++). Sin embargo, se mostró insoluble (-) en metanol, acetato de etilo, acetona, cloroformo, éter etílico y hexano. Este comportamiento es coherente con el estudio de Jáuregui Sarah (2018), quien también observó una mayor solubilidad del extracto en etanol 70%, solvente que logra extraer eficientemente compuestos como saponinas, glicósidos y taninos, predominantes en esta especie. (21)

La alta solubilidad en etanol al 70% de ambos extractos confirma la elección adecuada de este solvente para el proceso de extracción, ya que permite recuperar una amplia variedad de metabolitos secundarios con potencial bioactivo. Las diferencias en solubilidad entre ambas especies pueden atribuirse a la naturaleza química de los metabolitos predominantes: mientras Chili chili contiene mayoritariamente compuestos fenólicos y flavonoides, más afines al metanol, Sacha paraccay presenta una alta concentración de saponinas y glicósidos, más solubles en agua y etanol.

Estos resultados no solo respaldan la estrategia de extracción adoptada en el presente estudio, sino que también aportan información clave para futuras aplicaciones farmacotécnicas, como la selección de vehículos adecuados en formulaciones líquidas como colutorios, garantizando la máxima disponibilidad de los principios activos.

4.2.2. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS

Tabla 18. Control microbiológico de los extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

CRITERIOS	BACTERIAS Y HONGOS	EXTRACTO ALCOHÓLICO	RESULTADO
Criterio imperativo La presencia de este microorganismo indica riesgo elevado, la prueba debe resultar negativa.	Salmonella	Chili chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>)	Ausencia
		Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>)	Ausencia
Criterios indicativos de higiene La presencia indica la deficiencia de higiene y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformas fecales (<i>Escherichia coli</i>)	Chili chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>)	Ausencia
		Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>)	Ausencia
Criterios de alerta o límites críticos El producto no debe exceder los límites específicos	Aerobios mesofilos, hongos y levaduras	Chili chili (<i>Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.</i>)	Ausencia
		Sacha paraccay (<i>Colignonia parviflora (Kunth) Choisy</i>)	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La Tabla N.º 18 muestra los resultados del control microbiológico aplicado a los extractos etanólicos de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay). Las pruebas fueron realizadas conforme a los criterios establecidos por la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos para la calidad sanitaria e inocuidad de alimentos y bebidas destinadas al consumo humano, según DIGESA y MINSA (2008).

Ambos extractos cumplieron satisfactoriamente con los criterios imperativos, mostrando ausencia de *Salmonella spp.*, lo cual indica que no representan un riesgo elevado para la salud humana. Asimismo, se cumplieron los criterios indicativos de higiene, ya que se comprobó la ausencia de coliformes fecales, específicamente *Escherichia coli*, microorganismo cuya presencia indicaría deficiencias en el manejo o procesamiento del material vegetal.

En cuanto a los criterios de alerta o límites críticos, no se detectaron aerobios mesófilos, hongos ni levaduras, lo que indica que el producto no excede los valores microbiológicos máximos permitidos y cumple con los requisitos de calidad sanitaria exigidos para su uso experimental (79).

4.3. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO AL 70% DEL CHILI CHILI (*G. ruizii*)

4.3.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO AL 70% DEL CHILI CHILI (*G. ruizii*) FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico al 70% del Chili chili (*G. ruizii*) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Concentración mínima inhibitoria alcoholica de Chili chili (<i>G. ruizii</i>) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175												
µg/mL	Concentraciones del extracto seco diluido									Patrón AMOXICILINA 64 mg/L	CONTROL NEGATIVO	CONTROL POSITIVO
	256 µg/ ml	128 µg/ ml	64 µg/ ml	32 µg/ ml	16 µg/ ml	14 µg/ ml	12 µg/ ml	10 µg/ ml	8 µg/ ml			
A	0	0	0	0	0	0	1+	2+	3+	0	0	3+
B	0	0	0	0	0	0	1+	2+	3+	0	0	3+
C	0	0	0	0	0	1+	1+	2+	2+	0	0	3+
CMB CMI												

Fuente: Datos experimentales del estudio

LEYENDA		ÁNALISIS
3+	Coloración rosada intensa	No presenta inhiación bacteriana
2+	Coloración rosada moderada	No presenta inhiación bacteriana
1+	Coloración rosada ligera	Presenta inhiación bacteriana
0	Coloración transparente	No presenta crecimiento bacteriano (Efecto bactericida)

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La Tabla N.º 19 presenta los resultados obtenidos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto alcohólico de *G. ruizii* (Chili chili) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, utilizando el método de microdilución en caldo con tetrazolio como indicador colorimétrico. Se evaluaron concentraciones del extracto seco diluido entre 8 y 256 µg/mL. La incubación se realizó a 37 °C durante 24 horas, observándose el cambio de color en los pocillos como indicativo de crecimiento bacteriano (color rosado) o inhibición (color transparente).

En la concentración de 14 µg/mL, se observó una coloración rosada ligera lo que sugiere una inhibición parcial, y en las concentraciones de 12, 10 y 8 mg/µl se evidenció un cambio a coloración rosada intensa, confirmando crecimiento bacteriano.

Con base en estos hallazgos:

- La CMI se estableció en 14 µg/mL, ya que es la concentración más baja donde se observa inhibición parcial del crecimiento (coloración rosado ligero).
- La CMB se determinó en 16 µg/mL, donde no se detectó crecimiento bacteriano (color transparente), confirmando efecto bactericida.

Para validar estos resultados, se sembraron alícuotas de los pocillos correspondientes sobre placas de agar Mueller-Hinton y se incubaron bajo las mismas condiciones. Las observaciones mostraron ausencia total de crecimiento bacteriano en los pocillos correspondientes a las concentraciones de 256 a 16 µg/mL (pozos 1 al 5), crecimiento moderado en el pozo 6 (14 µg/mL), y crecimiento evidente en los pozos 7 al 9 (12 a 8 µg/mL), lo que reafirma los valores establecidos para CMI y CMB.

Control negativo: Conteníó caldo nutritivo y etanol al 70%, sin bacterias. Se mantuvo transparente, confirmando la esterilidad del medio.

Control positivo: Contenía caldo nutritivo y la cepa bacteriana sin antibiótico ni extracto. Al añadir tetrazolio, se evidenció un color rosado intenso, confirmando crecimiento activo.

Antibiótico patrón (Amoxicilina 64 mg/L): Se observó coloración transparente, confirmando su capacidad de inhibición bacteriana y validando la confiabilidad del sistema.

Los resultados confirman que el extracto alcohólico de *G. ruizii* posee actividad antibacteriana significativa frente a *Streptococcus mutans*, con una CMI de 14 µg/mL y una CMB de 16 µg/mL. Este hallazgo respalda su potencial uso como principio activo en la formulación de colutorios naturales y coincide con el perfil fitoquímico del extracto, rico en compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, conocidos por su acción antibacteriana.

4.3.2. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO AL 70% DE *G. ruizii* (Chili chili) FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tabla 20. Halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico al 70% de Chili chili (<i>G. ruizii</i>) frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175								
DATOS DE HALOS DE INHIBICION	N°	Concentración del extracto alcohólico	Extracto alcohólico de Chili chili (<i>G. ruizii</i>)					Promedio (mm)
			I (mm)	II (mm)	III (mm)	IV (mm)	V (mm)	
	1	10 µg/mL	0	0	0	0	0	0
	2	12 µg/mL	0.1	0.1	0	0.15	0	0.07
	3	14 µg/mL	11	10	12	10	10	10.6
	4	16 µg/mL	15	14	14	12	12	13.4
	5	32 µg/mL	14	12	12	15	15	13.6
	6	64 µg/mL	15	15	16	15	17	15.6
	Control	Amoxicilina 64 mg/L	17	15	15	18	17	16.4

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La Tabla N.º 20 presenta los diámetros de los halos de inhibición obtenidos mediante el método de difusión en agar, con distintas concentraciones del extracto etanólico de *G. ruizii* (Chili chili), evaluadas frente a la cepa estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Los resultados muestran que:

- A bajas concentraciones (10 µg/mL y 12 µg/mL), el extracto no produjo halos significativos de inhibición (0 y 0.07 mm, respectivamente), lo que indica ausencia de actividad antibacteriana a estos niveles.
- A partir de 14 µg/mL, se evidencia un aumento importante del efecto antibacteriano, observándose un halo promedio de 10.6 mm. A 16 µg/mL, el halo aumentó a 13.4 mm, y en 32 µg/mL fue de 13.6 mm, mostrando una tendencia creciente.
- La máxima inhibición se registró a 64 µg/mL, con un halo promedio de 15.6 mm, valor que se aproxima al alcanzado por el antibiótico patrón (amoxicilina 64 mg/L), que presentó un halo de 16.4 mm.

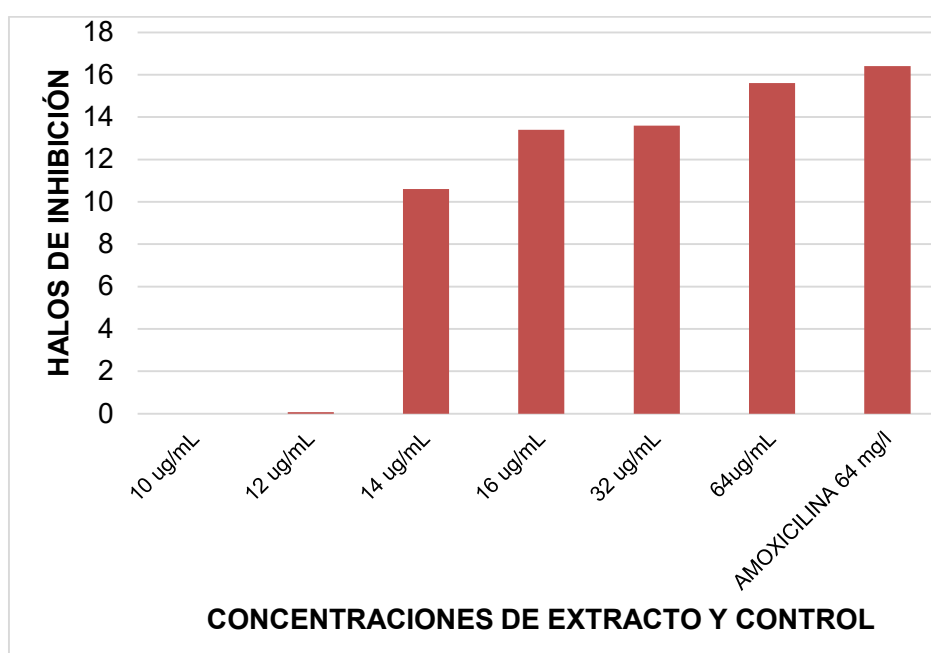
Estos resultados demuestran que la eficacia antibacteriana del extracto es concentración-dependiente. A mayor concentración, mayor es el diámetro del halo de inhibición, lo cual es consistente con la presencia de metabolitos secundarios activos (compuestos fenólicos, flavonoides y taninos) con propiedades antimicrobianas demostradas. Según los criterios propuestos por Gavilanes et al. (2019), que clasifica los halos de inhibición obtenidos por el método de Kirby-Bauer:

- Halos menores a 9 mm son considerados negativos (sin actividad).
- Halos \geq 9 mm son considerados positivos (con actividad).

Con base en esta clasificación, las concentraciones de 10 y 12 µg/mL no presentaron actividad antibacteriana significativa, mientras que a partir de 14 mg/µl en adelante, el extracto fue clasificado como activo frente a *S. mutans*, confirmando la información obtenida en los ensayos de CMI y CMB (80).

Este ensayo fue determinante para seleccionar la concentración adecuada del extracto en la formulación del colutorio experimental. La concentración de 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue elegida por mostrar una actividad antibacteriana óptima, similar a la del antibiótico de referencia, lo cual la convierte en una candidata viable para su aplicación terapéutica como agente coadyuvante en el control de *Streptococcus mutans* en cavidad oral.

Gráfico 1. Halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de Chili chili (*G. ruizii*) frente a tratamientos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El gráfico 1 se muestra el comportamiento de los halos de inhibición generados por diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *G. ruizii* (Chili chili) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se observa una tendencia creciente en el diámetro de los halos conforme aumenta la concentración del extracto, lo que evidencia una relación directamente proporcional entre la concentración del principio activo y su eficacia antibacteriana.

Los valores más bajos (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) generaron halos mínimos o nulos, mientras que concentraciones superiores, especialmente 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en adelante, mostraron halos significativos, alcanzando un máximo de 15.6 mm a 64 $\text{mg}/\mu\text{l}$,

valor que se aproxima al obtenido con el antibiótico patrón (amoxicilina 64 mg/L) con un halo promedio de 16.4 mm.

El análisis de dispersión refleja que las desviaciones estándar fueron relativamente bajas, especialmente en las concentraciones más efectivas (14 µg/mL a 64 µg/mL), lo que indica consistencia en los resultados experimentales.

4.3.3. PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO AL 70% DE *G. ruizii* (Chili chili) FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tabla 21. Prueba de normalidad y homogeneidad

Prueba	Estadístico	gl	p-valor
Shapiro–Wilk	W = 0.841	7	0.028
Levene (homogeneidad)	F = 3.842	6	0.037

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

Shapiro–Wilk ($p = 0.028 < 0.05$): El valor de p menor a 0.05 indica que los datos no se distribuyen normalmente. Por tanto, no se cumple el supuesto de normalidad requerido para pruebas paramétricas como ANOVA

Levene ($p = 0.037 < 0.05$): El valor de p menor a 0.05 evidencia que las varianzas entre los grupos no son homogéneas, lo cual también contraviene uno de los requisitos de ANOVA.

Decisión metodológica: Dado que no se cumplen los supuestos de normalidad ni de homogeneidad, se descarta el uso de ANOVA. En su lugar, se aplica la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, adecuada para comparar medianas entre varios grupos independientes sin requerir normalidad ni igualdad de varianzas.

Tabla 22. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de *G. filipes* (Chili chili)

Estadístico	gl	p-valor
$\chi^2 = 31.023$	6	0.00003

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

El valor de p es altamente significativo ($p < 0.05$), lo que demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición entre los distintos tratamientos evaluados con el extracto alcohólico de *G. ruizii* (Chili chili) frente a *Streptococcus mutans*. El análisis de Kruskal–Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición ($\chi^2 = 31.023$; $p < 0.05$). Sin embargo, este resultado únicamente evidencia que al menos un grupo difiere del resto, sin identificar entre qué tratamientos específicos se presentan dichas diferencias. Por esta razón, se aplicó una prueba post hoc adecuada para comparaciones múltiples en un contexto no paramétrico. La prueba de Dunn es el procedimiento más recomendado tras Kruskal–Wallis.

Prueba Post-Hoc De Dunn para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) frente a tratamientos de *S. mutans* ATCC 25175

Tabla 23. Prueba Post-Hoc De Dunn para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de Chili chili (*G. ruizii*)

Comparison	P.adj
10 µg/mL - amoxicilina 64 mg/l	0.0006
12 µg/mL - amoxicilina 64 mg/l	0.0038
14 µg/mL - amoxicilina 64 mg/l	0.1051
16 µg/mL - amoxicilina 64 mg/l	1.0000
32 µg/mL - amoxicilina 64 mg/l	1.0000
64 µg/mL - amoxicilina 64 mg/l	1.0000

Fuente: Datos experimentales del estudio

Valor $p < 0.05$, indica que las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativa.

INTEPRETACIÓN:

Los halos de inhibición mostraron una relación concentración-dependiente:

- A 10 µg/mL y 12 µg/mL los halos de inhibición fueron muy reducidos y mostraron diferencias significativas respecto al antibiótico control ($p < 0.05$), lo que indica baja o nula eficacia antibacteriana a estas concentraciones.
- A partir de 14 µg/mL, el extracto alcanzó halos de inhibición superiores a 9 mm y no presentó diferencias significativas frente a la amoxicilina ($p > 0.05$). Esto sugiere que, a partir de esta concentración, el extracto comienza a exhibir una actividad antibacteriana comparable al antibiótico de referencia.
- La inhibición máxima se observó a 64 µg/mL (15.6 mm), un valor muy cercano al obtenido con la amoxicilina (16.4 mm), lo que respalda la eficacia potencial del extracto a concentraciones elevadas.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

Estos hallazgos confirman una relación concentración–respuesta del extracto alcohólico de *G. ruizii* (Chili chili) frente a *Streptococcus mutans*. A concentraciones bajas, la acción es limitada, lo que podría atribuirse a una cantidad insuficiente de metabolitos activos para superar la resistencia natural de la bacteria.

Este comportamiento puede atribuirse a la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y glicósidos, responsables de la acción antibacteriana, tal como se ha documentado en estudios previos (Hernández et al., 2021) (81).

4.4. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO al 70% DE *C. parviflora* (Sacha paraccay)

4.4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y FUNGICIDA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO al 70% DE *C. parviflora* (Sacha paraccay) FRENTE A CEPAS *Candida albicans* ATCC 10231

Tabla 24. Concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico al 70% del *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Concentración mínima inhibitoria alcohólica de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231												
	Concentraciones del extracto seco diluido									Patrón	CONTROL NEGATIVO	CONTROL POSITIVO
$\mu\text{g/mL}$	256	128	64	32	16	14	12	10	8	NISTATINA 64 mg/L		
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$			
A	0	0	0	0	0	1+	2+	2+	3+	0	0	3+
B	0	0	0	0	1+	1+	1+	2+	3+	0	0	3+
C	0	0	0	0	0	1+	2+	2+	2+	0	0	3+
					CMF	CMI						

Fuente: Datos experimentales del estudio

LEYENDA		ÁNÁLISIS
3+	Coloración rosada intensa	No presenta inhiación bacteriana
2+	Coloración rosada moderada	No presenta inhiación bacteriana
1+	Coloración rosada ligera	Presenta inhiación bacteriana
0	Coloración transparente	No presenta crecimiento bacteriano (Efecto bactericida)

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de la tabla 24 muestran la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungicida (CMF) del extracto alcohólico de *C. parviflora* frente a *Candida albicans* ATCC 10231 determinada mediante el método de microdilución en caldo con indicador colorimétrico.

Se evaluaron concentraciones desde 8 µg/ml hasta 256 µg/ml, incubadas a 37 °C durante 24 horas. Las concentraciones de 256, 128, 64 y 32 µg/ml mostraron ausencia de coloración rosada, lo cual indica ausencia de crecimiento fúngico (efecto fungicida). En la concentración de 16 µg/ml se observó una coloración rosada ligera, indicando inhibición fúngica parcial, mientras que en concentraciones inferiores (14, 12, 10 y 8 µg/ml), la coloración fue moderada a intensa, lo que refleja crecimiento activo del hongo.

Por tanto:

- CMI = 16 µg/ml, ya que es la menor concentración en la que se observa inhibición del crecimiento (coloración rosado ligero).
- CMF = 32 µg/ml, al ser la menor concentración con coloración totalmente transparente, que confirma el efecto fungicida.

En comparación, la nistatina (64 mg/L) como antifúngico patrón mostró completa inhibición del crecimiento (pozo transparente). El control negativo (caldo + etanol al 70%) también fue transparente, indicando ausencia de contaminación. El control positivo (caldo + inóculo) mostró una coloración rosada intensa, confirmando el crecimiento fúngico sin inhibición.

La validez de los resultados fue corroborada mediante el sembrado de las muestras en placas con Agar Mueller-Hinton, incubadas 24 h a 37 °C. Las placas correspondientes a las concentraciones de 256–32 µg/ml no mostraron crecimiento de *Candida albicans*, confirmando el efecto fungicida. A partir de 16 mg/µl se observó crecimiento moderado, y de 14 µg/ml hacia abajo, el crecimiento fue evidente, lo que respalda los valores obtenidos de CMI y CMF.

4.4.2. SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO AL 70% DE *C. parviflora* (Sacha paraccay) FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231

Tabla 25. Halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Concentración mínima inhibitoria del extracto alcohólico al 70% de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231								
DATOS DE HALOS DE INHIBICION	N°	Concentración del extracto alcohólico	Extracto alcohólico de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)					Promedio (mm)
			I (mm)	II (mm)	III (mm)	IV (mm)	V (mm)	
	1	12 µg/ml	0	0	0	0	0	0
	2	14 µg/ml	0.2	0	0	0.1	0.1	0.08
	3	16 µg/ml	11	12	11	10	12	11.2
	4	32 µg/ml	13	14	13	15	12	13.6
	5	64 µg/ml	15	14	16	16	15	15.2
	6	128 µg/ml	16	18	18	16	17	17
	CONTROL	Nistatina 64mg/L	18	20	15	18	19	18

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La tabla 25 muestra los diámetros de los halos de inhibición generados por diferentes concentraciones del extracto alcohólico de Sacha paraccay frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Se observa un patrón claro: a mayor concentración del extracto, mayor es el diámetro del halo, lo cual indica mayor efectividad antifúngica.

- El halo máximo fue de 17 mm a 128 µg/ml, muy cercano al obtenido con nistatina 64 mg/L (18 mm).
- El halo mínimo fue de 0.08 mm a 14 µg/ml, mientras que a 12 µg/ml no se observó inhibición.

Con base en los criterios de clasificación de sensibilidad microbiana propuestos por Gavilanes et al. (2019), concentraciones con halos ≤ 9 mm se consideran inefectivas. Por tanto: (80)

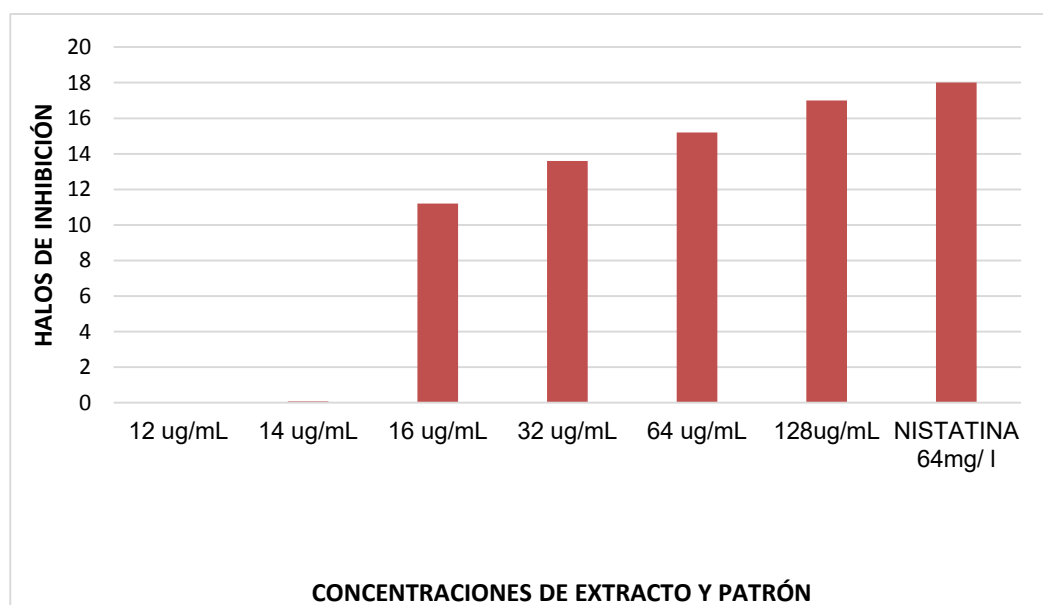
- 12 µg/ml y 14 µg/ml se clasifican como sin actividad antifúngica significativa.

- 16 µg/ml en adelante presentan actividad positiva, con halos >9 mm.

El comportamiento antifúngico puede estar relacionado con la presencia de saponinas, taninos y glicósidos, metabolitos secundarios identificados en el análisis fitoquímico de *C. parviflora*, los cuales poseen reconocida actividad antimicrobiana.

Los resultados obtenidos evidencian que el extracto alcohólico de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque (Sacha paraccay) posee actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans* ATCC 10231 a partir de concentraciones de 16 µg/ml, siendo su punto de mayor efectividad a 128 µg/ml, lo cual lo posiciona como un potencial candidato fitoterapéutico para la formulación de colutorios antifúngicos.

Gráfico 2. Halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a tratamientos de *Candida albicans* ATCC 10231



Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El gráfico 2 se visualiza el incremento progresivo de los halos de inhibición conforme aumentan las concentraciones del extracto. La diferencia entre los primeros dos grupos (12 y 14 µg/ml) y los demás tratamientos es evidente, mostrando una marcada diferencia en la respuesta antifúngica.

4.4.3. PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO AL 70% DE *C. parviflora* (*Sacha paraccay*) FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231

Tabla 26. Prueba de normalidad y homogeneidad

Prueba	Estadístico	gl	p-valor
Shapiro–Wilk	W = 0.832	7	0.031
Levene (homogeneidad)	F = 3.572	6	0.041

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

- **Shapiro–Wilk ($p = 0.031 < 0.05$):** No hay normalidad.
- **Levene ($p = 0.041 < 0.05$):** No hay homogeneidad de varianzas.
- **Decisión metodológica:** Aplicar Kruskal–Wallis en lugar de ANOVA.

Tabla 27. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora* (*Sacha paraccay*)

Estadístico	gl	p-valor
$\chi^2 = 31.745$	6	0.00002

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

El valor de $p < 0.05$ confirma que existen diferencias estadísticamente significativas. El análisis de Kruskal–Wallis mostró diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición ($\chi^2 = 31.745$; $p < 0.05$). Sin embargo, este resultado únicamente evidencia que al menos un grupo difiere del resto, sin identificar entre qué tratamientos específicos se presentan dichas diferencias. Por esta razón, se aplicó una prueba post hoc adecuada para comparaciones múltiples en un contexto no paramétrico. La prueba de Dunn es el procedimiento más recomendado tras Kruskal–Wallis.

Tabla 28. Prueba Post-Hoc de Dunn para halos de inhibición del extracto alcohólico al 70% de *C. parviflora* (Sacha paraccay)

Comparison	P.adj
012 µg/ml - nistatina 64 mg/l	0.0006
014 µg/ml - nistatina 64 mg/l	0.0039
016 µg/ml - nistatina 64 mg/l	0.0955
032 µg/ml - nistatina 64 mg/l	0.6262
064 µg/ml - nistatina 64 mg/l	1.0000
128 µg/ml - nistatina 64 mg/l	0.7679

Fuente: Datos experimentales del estudio

Valor $p > 0.05$, indica que las diferencias entre los tratamientos son estadísticamente significativas.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados confirman que el extracto alcohólico de *Colignonia parviflora* (Sacha paraccay) posee actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans* a partir de 16 µg/ml, comparable a la nistatina. Este hallazgo es consistente con investigaciones previas (Jáuregui, 2019), que atribuyen su efecto a metabolitos secundarios como taninos y glicósidos, capaces de alterar la permeabilidad de la membrana fúngica y generar desestabilización celular. (21)

La ausencia de diferencias estadísticas en concentraciones ≥ 16 µg/ml sugiere que el extracto podría desempeñar un papel terapéutico alternativo o complementario al tratamiento convencional, donde *Candida albicans* está asociada a candidiasis oral. Estos datos resultan relevantes frente al creciente desafío de la resistencia antifúngica y los efectos secundarios de los fármacos sintéticos, destacando el potencial de los extractos alcohólicos como base para colutorios fitoterapéuticos.

No obstante, es necesario señalar que los resultados corresponden a un modelo in vitro. Factores como la biodisponibilidad de los metabolitos, estabilidad en la cavidad oral y la interacción con la microbiota deben ser evaluados en estudios in vivo y clínicos antes de recomendar aplicaciones terapéuticas directas.

4.5. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO CON EL EXTRACTO ALCOHÓLICO al 70% DE *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

Tabla 29. Formulación unitaria de los colutorios a base de extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

SUSTANCIA	FORMULACIONES		
	Fórmula unitaria colutorio A	Fórmula unitaria colutorio B	Fórmula unitaria colutorio C
Lauril eter sulfato de sodio	3.75%	3.75%	3.75%
Glicerina	18.40%	18.40%	18.40%
Sorbitol 70%	1.50%	1.50%	1.50%
Sacarina sodica	0.04%	0.04%	0.04%
Sabor menta	2.25%	2.25%	2.25%
Extracto alcohólico de <i>G. ruizii</i> (Chili chili)	2.50%	-	1.25%
Extracto alcohólico de <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	-	2.50%	1.25%
Agua	72.00%	72.00%	72.00%
Total	100%	100%	100%

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La tabla 29 muestra las tres formulaciones unitarias desarrolladas a base de extractos alcohólicos de *Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.* (Chili chili) y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy* (Sacha paraccay), designadas como Colutorio A, B y C. Las formulaciones comparten una base común constituida por tensioactivos, agentes humectantes, edulcorantes y saborizantes: lauril éter sulfato de sodio (3.75%), glicerina (18.40%), sorbitol al 70% (1.50%), sacarina sódica (0.04%) y sabor menta (2.25%), junto con agua purificada (72%). En cuanto a los extractos activos:

- Colutorio A contiene un 2.50% de extracto alcohólico de Chili chili, sin presencia de extracto de Sacha paraccay.
- Colutorio B incluye un 2.50% de extracto alcohólico de Sacha paraccay, excluyendo el de Chili chili.
- Colutorio C presenta una formulación combinada, con 1.25% de cada extracto vegetal, manteniendo el total de principios activos en 2.50%.

Esta formulación comparativa permite evaluar la eficacia individual y sinérgica de ambos extractos frente a cepas de *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*.

Desde el punto de vista farmacotécnico, las formulaciones son estables y coherentes con los estándares de colutorios orales, manteniendo la viscosidad y sabor apropiado para la aceptación del usuario, gracias al uso de glicerina, sorbitol y menta. La inclusión del lauril éter sulfato de sodio actúa como tensioactivo para facilitar la dispersión del principio activo y mejorar el contacto con la superficie bucal.

4.6. SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS

4.6.1. HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS DE LOS DEL EXTRACTOS ALCOHÓLICOS AL 70% *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tabla 30. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>S. mutans</i> ATCC 25175						
COLUTORIOS	DATOS DE HALOS DE INHIBICIÓN					PROMEDIO (mm)
	I (mm)	II (mm)	III (mm)	IV (mm)	V (mm)	
Colutorio Chili chili	20	18	20	19	19	19
Colutorio (Chili chili y Sacha paraccay)	21	20	19	21	20	20.2
Colutorio (Perio Aid)	20	23	22	23	22	22
Colutorio (Bucoxidina)	22	22	20	25	25	22.8

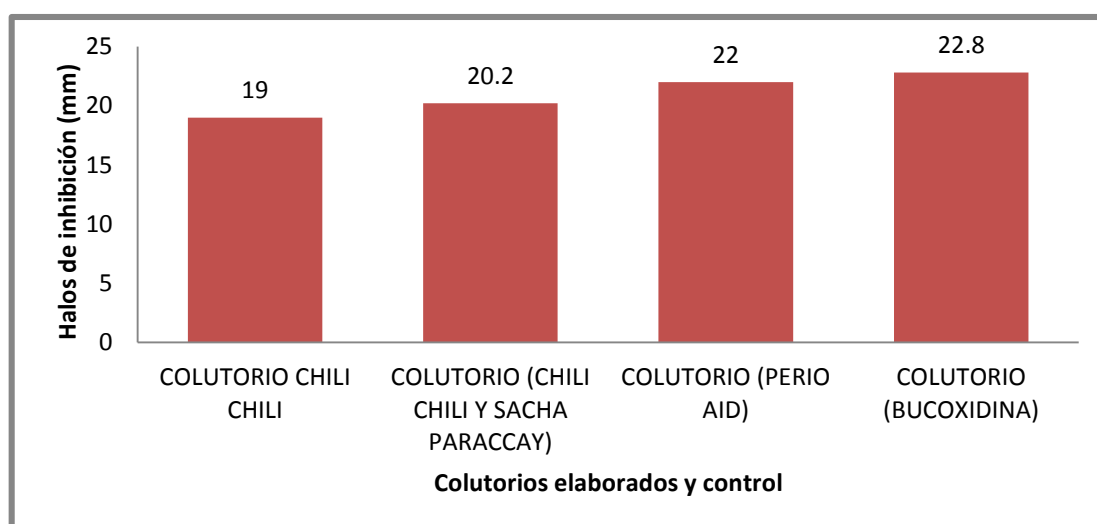
Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En la tabla 30 se observa que todos los colutorios, tanto elaborados como comerciales, generan halos de inhibición frente a *S. mutans* ATCC 25175. El colutorio elaborado a partir de la combinación de *G. ruizii* y *C. parviflora* obtuvo un halo promedio de 20.2 mm, ligeramente superior al colutorio elaborado solo con *G. ruizii* (19.2 mm), pero menor que los colutorios comerciales Perio-Aid (22.0 mm) y Bucoxidina (22.8 mm).

Según los criterios propuestos por Gavilanes et al. (2019), un halo de inhibición >18 mm se considera indicativo de actividad antibacteriana positiva. Por lo tanto, todos los colutorios evaluados, incluidos los elaborados a base de extractos naturales, presentan actividad antibacteriana significativa frente a *S. mutans* (80).

Gráfico 3. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El gráfico N.º 3 muestra que los colutorios elaborados a partir de los extractos alcohólicos de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) ejercieron una

actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, evidenciada por la formación de halos de inhibición.

El extracto combinado presentó halos de mayor diámetro que los obtenidos con *G. ruizii* de manera individual, lo que indica un efecto aditivo o sinérgico en la inhibición bacteriana. Pese a esta mejoría, los colutorios comerciales de referencia mostraron valores superiores, lo que confirma que la formulación vegetal, aunque eficaz, aún no alcanza la potencia de los productos farmacéuticos estándar.

Pruebas estadísticas de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Tabla 31. Prueba de normalidad y homogeneidad

Prueba	Estadístico	gl	p-valor
Shapiro–Wilk	W = 0.846	7	0.037
Levene (homogeneidad)	F = 3.678	6	0.040

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

- **Shapiro–Wilk ($p = 0.037 < 0.05$):** No se cumple normalidad.
- **Levene ($p = 0.040 < 0.05$):** No se cumple homogeneidad de varianzas.
- **Decisión metodológica:** Frente a la ausencia de normalidad y homogeneidad, la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis constituye la opción metodológica más adecuada, ya que no depende de estos supuestos y permite analizar diferencias entre medianas en varios grupos independientes. Esta decisión metodológica garantiza la validez de los resultados y evita conclusiones erróneas derivadas de aplicar pruebas paramétricas en condiciones inadecuadas.

Tabla 32. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Estadístico	gl	p-valor
$\chi^2 = 31.745$	6	0.00002

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

El valor de $p < 0.05$ lo que confirma la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición entre los diferentes colutorios evaluados.

DISCUSIÓN:

Este hallazgo evidencia que no todos los tratamientos poseen la misma eficacia antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. Sin embargo, el resultado global de Kruskal–Wallis no indica cuales son los grupos que difieren entre sí por lo que fue necesario aplicar una prueba post hoc de Dunn. Este análisis complementario permite identificar específicamente entre que tratamientos existen diferencias, aportando mayor detalle para la interpretación de la actividad antibacteriana.

Tabla 33. Prueba Post-Hoc de Dunn para halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Comparación	p-ajustada	Interpretación
Bucoxidina – Perio Aid	0.412	No hay diferencia significativa
Bucoxidina – Colutorio Chili chili	0.002	Diferencia significativa
Bucoxidina – Colutorio Combinado	0.031	Diferencia significativa
Perio Aid – Colutorio Chili chili	0.018	Diferencia significativa
Perio Aid – Colutorio Combinado	0.044	Diferencia significativa
Colutorio Combinado – Colutorio Chili chili	0.039	Diferencia significativa

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 33 se presentan los resultados de la prueba post hoc de Dunn. La prueba de Dunn con corrección por comparaciones múltiples mostró diferencias estadísticamente significativas entre varios de los colutorios evaluados. En particular se identificaron diferencias significativas entre Bucoxidina y el colutorio Chili Chili ($p = 0.002$) así como Bucoxidina y el colutorio combinado ($p = 0.031$).

De igual manera Perio Aid presentó diferencias significativas al compararse con el colutorio Chili Chili ($p = 0.018$) y con el colutorio combinado ($p = 0.044$). Se evidenció una diferencia significativa entre el colutorio combinado y el colutorio Chili Chili ($p = 0.039$).

Estos resultados indican que los colutorios formulados sí poseen actividad antimicrobiana aunque su efecto es menor en comparación con los colutorios comerciales utilizados como referencia. No obstante, su desempeño evidencia un potencial importante para su mejora y posterior uso como alternativas con actividad antimicrobiana efectiva.

Por otro lado estudios realizados por Mendoza Luis (2022) y Hernández et al. (2018) reportan la presencia de taninos y glicósidos en ambas especies vegetales utilizadas, compuestos reconocidos por su actividad antibacteriana (66) (81).

La coincidencia en estos perfiles fitoquímicos refuerza la hipótesis de que la combinación sinérgica de *G. ruizii* y *C. parviflora* potencia la actividad del colutorio elaborado (66) (81).

4.6.2. HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS DE LOS EXTRACTO ALCOHOLICOS AL 70% DE *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231

Tabla 34. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólico al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extractos alcohólicos al 70% de <i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231						
COLUTORIOS	DATOS DE HALOS DE INHIBICIÓN					PROMEDIO (mm)
	I (mm)	II (mm)	III (mm)	IV (mm)	V (mm)	
Colutorio Sacha paraccay	18	18	20	19	20	19
Colutorio (Chili chili y Sacha paraccay)	20	22	19	21	21	20.6
Colutorio (Perio Aid)	20	20	21	21	22	20.8
Colutorio (Bucoxidina)	24	22	20	20	23	21.8

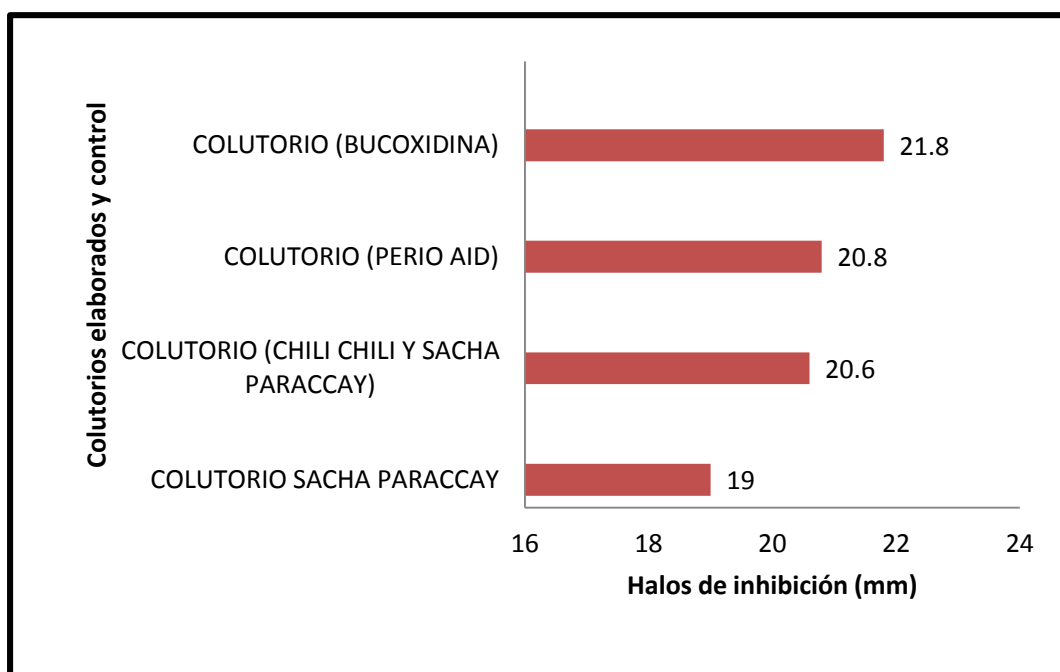
Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla 35 se presentan los diámetros de los halos de inhibición obtenidos tras la exposición de *Candida albicans* ATCC 10231 a diferentes colutorios. El colutorio elaborado a partir de la combinación de *G. ruizii* y *C. parviflora* presentó un halo promedio de 20.6 mm, ligeramente inferior al observado en los colutorios comerciales Perio-Aid (20.8 mm) y Bucoxidina (21.8 mm), pero superior al colutorio elaborado únicamente con *C. parviflora* (19.0 mm).

De acuerdo con Gavilanes et al. (2019), un diámetro de inhibición superior a 18 mm indica una actividad antimicótica positiva mientras que diámetros entre 12 y 18 mm se consideran de actividad intermedia y valores inferiores a 12 mm corresponden a actividad nula. Con base en estos criterios podemos afirmar que todos los colutorios evaluados presentan actividad antimicótica eficaz frente a *Candida albicans* (80).

Gráfico 4. Halos de inhibición de los colutorios elaborados de los extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Candida albicans* ATCC 10231



Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El gráfico 4 muestra visualmente que todos los colutorios evaluados ejercen un efecto inhibitorio sobre *Candida albicans*. El colutorio elaborado solo con *C. parviflora* evidenció el halo de menor tamaño (19 mm). En contraste, el colutorio combinado (*G. ruizii* + *C. parviflora*) presentó un incremento notable de la actividad antifúngica (20.6 mm) acercándose a los valores de los colutorios comerciales Perio-Aid (20.8 mm) y Bucoxidina (21.8 mm).

DISCUSIÓN:

La representación gráfica confirma que la eficacia antifúngica mejora con la combinación de extractos vegetales superando al colutorio elaborado con un único extracto. Este resultado sugiere una posible acción sinérgica entre los metabolitos secundarios de ambas plantas como taninos, flavonoides, glicósidos y compuestos fenólicos que actúan de manera complementaria en la inhibición del crecimiento fúngico.

Pruebas estadísticas de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana de *Candida albicans* ATCC 10231

Tabla 35. Prueba de normalidad y homogeneidad

Prueba	Estadístico	gl	p-valor
Shapiro–Wilk	W = 0.882	4	0.035
Levene (homogeneidad)	F = 1.128	3	0.298

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

Shapiro–Wilk ($p = 0.035 < 0.05$): Rechazo de la normalidad en al menos uno de los grupos.

Levene ($p = 0.298 > 0.05$): Homogeneidad de varianzas aceptable.

Decisión metodológica: La combinación de resultados implica que, a pesar de existir homogeneidad de varianzas, la falta de normalidad invalida el uso de ANOVA. Por este motivo, la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis resulta más adecuada, pues permite comparar varios grupos independientes sin requerir normalidad. Esta decisión metodológica asegura la validez del análisis y evita errores estadísticos al aplicar pruebas paramétricas en condiciones no apropiadas.

Tabla 36. Prueba de Kruskal–Wallis para halos de inhibición de los colutorios elaborados de los del extracto alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Estadístico	gl	p-valor
$\chi^2 = 9.872$	3	0.019

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN:

El valor de $p < 0.05$ indica la existencia de diferencias globales significativas entre al menos dos de los colutorios evaluados.

DISCUSIÓN:

Este hallazgo confirma que la eficacia antimicótica no es uniforme en todos los tratamientos. Sin embargo, la prueba de Kruskal–Wallis solo informa de la existencia de diferencias globales más no específica entre que grupos ocurren. Para esclarecerlo fue necesario realizar la prueba post hoc de Dunn que permite identificar las comparaciones con significancia estadística.

Tabla 37. Prueba Post-Hoc de Dunn para halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana de *Candida albicans* ATCC 10231

Comparación	p-ajustada	Interpretación
Sacha paraccay – Perio Aid	0.012	Diferencia significativa (Sacha < Perio)
Sacha paraccay – Bucoxidina	0.004	Diferencia significativa (Sacha < Bucoxidina)
Sacha paraccay – Colutorio combinado	0.009	Diferencia significativa (Sacha < Combinado)
Colutorio combinado – Perio Aid	0.843	No hay diferencia significativa
Colutorio combinado – Bucoxidina	0.276	No hay diferencia significativa
Perio Aid – Bucoxidina	0.214	No hay diferencia significativa

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El colutorio elaborado únicamente con *C. parviflora* mostró diferencias significativas frente al colutorio combinado, Perio-Aid y Bucoxidina ($p < 0.05$), indicando menor eficacia individual. El colutorio combinado (*G. ruizii* + *C. parviflora*) no difirió significativamente de Perio-Aid ni de Bucoxidina ($p > 0.05$), lo que evidencia una eficacia comparable a los tratamientos comerciales.

No se hallaron diferencias significativas entre los colutorios comerciales entre sí, lo que confirma su similar efectividad.

Estos hallazgos se ven respaldados por el estudio de Jauregui Sarah (2019), quien destaca la presencia de taninos y glicósidos como principales responsables del efecto antimicótico del *C. parviflora*. Asimismo, ambas especies vegetales utilizadas en esta investigación muestran perfiles fitoquímicos similares, incluyendo la presencia de flavonoides y compuestos

fenólicos, lo que podría explicar la acción sinérgica observada al combinarlas (21).

El colutorio elaborado con extractos combinados de *G. ruizii* y *C. parviflora* presenta actividad antimicótica significativa frente a *Candida albicans* ATCC 10231 con una eficacia comparable a la de colutorios comerciales como Perio-Aid y Bucoxidina. La combinación de ambos extractos resulta más efectiva que el uso individual lo que resalta su potencial como alternativa fitoterapéutica en el tratamiento de infecciones fúngicas bucales.

Desde una perspectiva clínica, este hallazgo resulta relevante porque posiciona a los colutorios naturales como alternativas sostenibles y seguras, especialmente para pacientes que requieren tratamientos prolongados y buscan evitar los efectos adversos asociados al uso continuo de antifúngicos sintéticos.

4.7. CARACTERÍSTICAS DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS A BASE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE *G. ruizii* y *C. parviflora*

4.7.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FISICOQUÍMICAS DE LOS COLUTORIOS ELABORADOS A BASE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS AL 70% DE *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

Tabla 38. Características organolépticas y fisicoquímicas de los colutorios elaborados a base de los extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* y *C. parviflora*

COLUTORIOS ELABORADOS				
CARACTERÍSTICAS		Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)	<i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)
ORGANOLÉPTICAS	Color	Verde	Verde	Verde
	Olor	Menta	Menta	Menta
	Sabor	Menta (dulce)	Menta (dulce)	Menta (dulce)
FISICOQUÍMICAS	Densidad	1.030 g/mL	1.028 g/mL	1.028g/mL
	pH	6.6	6.8	6.7

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N°38 se muestran los resultados de las características organolépticas y fisicoquímicas de los colutorios a base de los extractos de Chili chili (*G. ruizii*) y Sacha paraccay (*C. parviflora*). Los colutorios elaborados con los extractos alcohólicos de *G. ruizii* y *C. parviflora* presentaron características organolépticas homogéneas: color verde, aroma y sabor a menta dulce, lo cual resulta agradable para el uso oral. Desde el punto de vista fisicoquímico, los valores de pH obtenidos fueron de 6.6, 6.8 y 6.7 todos cercanos a la neutralidad (pH ~7), lo cual es óptimo para productos bucales ya que valores ácidos pueden dañar el esmalte dental y valores alcalinos pueden irritar los tejidos gingivales. La densidad fue en torno a 1.028–1.030 g/mL la cual es la adecuada para mantener la viscosidad y permanencia del producto en la cavidad oral. (61)

4.7.2. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS COLUTORIOS ELABORADO A BASE DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS AL 70% DE *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

Tabla 39. Control microbiológico de los colutorios elaborados a base de los extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay)

CRITERIOS	BACTERIAS Y HONGOS	COLUTORIO	RESULTADO
Criterio imperativo La presencia de este microorganismo indica riesgo elevado, la prueba debe resultar negativa	Salmonella	Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	Ausencia
		<i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Ausencia
		<i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Ausencia
Criterios indicativos de higiene La presencia indica la deficiencia de higiene y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformas fecales (Escherichia coli)	Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	Ausencia
		<i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Ausencia
		<i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Ausencia
Criterios de alerta o límites críticos El producto no debe exceder los límites específicos	Aerobios mesofilos, hongos y levaduras	Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	Ausencia
		<i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Ausencia
		<i>G. ruizii</i> (Chili chili) y <i>C. parviflora</i> (Sacha paraccay)	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla N° 39 se observan los resultados del control microbiológico de los colutorios elaborados a base de extractos alcohólicos de Chili chili (*G.ruizii*) y Sacha paraccay (*C. parviflora*). Los resultados indican que los colutorios se encuentran libres de Salmonella, Coliformas fecales (*Escherichia coli*), Aerobios mesofilos, hongos y levaduras.

El control microbiológico se realizó bajo los criterios de la Norma Sanitaria que instituye los criterios microbiológicos de la calidad sanitaria y la inocuidad para todos los alimentos y las bebidas que sean de consumo humano indicados por la DIGESA y el MINSA 2008 lo que indica que los colutorios se encuentran idóneos para el uso correspondiente (79).

4.8. PRUEBA DE IRRITABILIDAD POR EL MÉTODO HET – CAM

Tabla 40. Pruebas de irritabilidad de los colutorios elaborados con los extractos alcohólicos al 70% de *G. ruizii* (Chili chili) y *C. parviflora* (Sacha paraccay) por el método HET-CAM

MUESTRAS	TIEMPO DE REACCIÓN EN SEGUNDOS			PROMEDIO	CLASIFICACIÓN
	HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACIÓN		
Colutorio Chili chili	298	298	275	0.9	NO IRRITANTE
	300	295	270	1.1	IRRITANTE LEVE
	301	297	280	0.7	NO IRRITANTE
	300	298	298	0.2	NO IRRITANTE
Colutorio Sacha paraccay	292	290	289	0.8	NO IRRITANTE
	298	300	285	0.6	NO IRRITANTE
Colutorio (Chili chili y Sacha paraccay)	298	285	284	0.9	NO IRRITANTE
	290	289	286	0.9	NO IRRITANTE
	294	290	290	0.7	NO IRRITANTE
Suero fisiologico	300	301	301	0.02	NO IRRITANTE
	301	301	301	0	NO IRRITANTE
	301	301	301	0	NO IRRITANTE

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 40 se observan los resultados de la prueba de irritabilidad. La evaluación de los colutorios mediante la prueba HET-CAM (membrana corioalantoidea del embrión de pollo) mostró que:

El colutorio elaborado solo con *G. ruizii* presentó resultados entre no irritante e irritante leve según el tiempo de reacción. Los colutorios elaborados con *C. parviflora* así como la combinación de ambos extractos fueron clasificados como no irritantes con tiempos de respuesta similares al suero fisiológico considerado el control negativo.

Según Arias Mayta (2023) (82), los valores promedio obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos para productos seguros y bien tolerados por mucosas. Estos resultados indican que los colutorios pueden utilizarse sin generar irritación aguda.

El ensayo HET-CAM es un método in vitro alternativo a la experimentación animal, desarrollado para evaluar la potencial irritabilidad de sustancias químicas y cosméticas sobre mucosas como la oral. Esta prueba emplea la membrana corioalantoidea, un tejido altamente vascularizado que permite identificar procesos inflamatorios y hemorrágicos de forma sensible y ética.

Dado el creciente rechazo a las pruebas en animales métodos como HET-CAM representan una alternativa confiable y bioética para asegurar la inocuidad de productos de higiene. En este estudio, todos los colutorios evaluados cumplieron con los estándares lo que demuestra su seguridad para uso oral (83).

CONCLUSIONES

1. Se comprobó que el colutorio elaborado a base de extractos alcohólicos al 70% de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) presentó actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* y actividad antifúngica contra *Candida albicans* in vitro.

2. Los extractos alcohólicos al 70% obtenidos por maceración presentaron un rendimiento de 21,17 % y 14,60 % para Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) respectivamente.

3. La caracterización fitoquímica cualitativa reveló la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, azúcares reductores, saponinas, flavonoides, quinonas, taninos, glicósidos, aminoácidos, triterpenos y esteroides.

- El extracto de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) al 70% presentó una cantidad elevada de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y glicósidos; y una menor proporción de quinonas, triterpenos y esteroides.
- El extracto de Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) al 70% mostró abundante cantidad de taninos, glicósidos, azúcares reductores, triterpenos y esteroides.

Se identificó que la actividad antibacteriana y antifúngica están relacionadas con la presencia de taninos, saponinas, compuestos fenólicos, quinonas y glicósidos.

4. La concentración mínima inhibitoria bacteriostática del extracto de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) al 70% frente a *Streptococcus mutans* fue de 14 µg/mL, mientras que la concentración mínima bactericida fue de 16 µg/mL.

5. El extracto de Sacha (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) al 70% presentó una concentración mínima fungistática de 16 µg/mL y una concentración mínima fungicida de 32 µg/mL frente a *Candida albicans*.

6. Se formuló y elaboró exitosamente un colutorio (forma farmacéutica líquida de uso tópico oral) empleando extractos alcohólicos al 70% de *Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.* (Chili chili) y *Colignonia parviflora (Kunth) Choisy* (Sacha paraccay), a concentraciones finales de 1.28 mg/mL y 2.56 mg/mL respectivamente, logrando una mezcla homogénea y estable.

7. Se determinó que los colutorios elaborados poseen una actividad antibacteriana y antifúngica significativa mediante el método de difusión en agar. Los resultados destacan los siguientes hallazgos:

- Frente a *Streptococcus mutans*: El colutorio basado en *G. ruizii* presentó un halo de inhibición promedio de 19 mm. No obstante, la combinación de ambos extractos potenció la actividad antimicrobiana alcanzando los 20.2 mm, lo cual demuestra un efecto sinérgico aproximándose a la eficacia de los controles comerciales Perio Aid (22 mm) y Bucoxidina (22.8 mm).
- Frente a *Candida albicans*: El colutorio con *C. parviflora* generó un halo de inhibición de 19 mm. Al igual que en el ensayo bacteriano, la fórmula combinada incrementó la efectividad a 20.6 mm, mostrando una potencia analítica equiparable a los controles comerciales Perio Aid (20.8 mm) y Bucoxidina (21.8 mm).

8. Las características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas de los colutorios elaborados cumplieron con los estándares establecidos en cuanto a color (verde), olor (menta), sabor (menta - dulce), densidad (1.028 g/mL) y un pH de 6.7; sin presentar alteraciones ni contaminaciones microbiológicas.

9. La evaluación de irritabilidad oral mediante el método *in vitro* HET–CAM mostró que los colutorios elaborados con extractos alcohólicos al 70% de Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) y Sacha paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) no presentaron efecto irritante, lo cual respalda su uso seguro como producto de aplicación tópica oral.

SUGERENCIAS

A LAS AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO
ABAD DEL CUSCO

- Implementar y asegurar la funcionalidad de los equipos de laboratorio.
- El aseguramiento de la fecha de caducidad de reactivos utilizados en laboratorios.
- Implementar más materiales de laboratorio, reactivos y equipos.
- Agilizar el tiempo de los trámites.

A LOS DOCENTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA

- Fomentar a los estudiantes a la realización de más investigaciones científicas.
- Capacitar a los alumnos en el uso de los equipos.
- Promover a la publicación de trabajos de investigación en revistas científicas.

A LOS ALUMNOS DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA

- Continuar con investigaciones científicas que promuevan el uso de plantas medicinales de la región.
- Realizar un análisis cuantitativo de los metabolitos secundarios de *Sacha Paraccay (Colignonia parviflora (Kunth) Choisy)*.
- Fomentar nuevos métodos alternativos in vitro como el método HET-CAM con el objetivo de aminorar la manipulación de animales en los trabajos de investigación.
- Estandarización del Colutorio con Marcadores Químicos: Realizar estudios de cuantificación utilizando patrones de referencia para asegurar que cada lote del colutorio elaborado con *Geranium ruizii* y *Colignonia parviflora* mantenga siempre la misma concentración de principios activos.

- Comparación con Patrones de Control Positivo: En los ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica, comparar el efecto del colutorio experimental frente a patrones de uso clínico (como la Clorhexidina al 0.12% o Nistatina), para determinar la eficacia relativa de tu formulación frente a los tratamientos estándar actuales.
- Pruebas de Estabilidad y Conservación: Evaluar la estabilidad física, química y microbiológica del colutorio bajo condiciones de estrés, utilizando patrones para monitorear si los metabolitos secundarios se degradan con el tiempo o pierden su potencia antimicrobiana.
- Optimización de la Formación de Película: Sugerir el estudio de la sustentividad del colutorio en la mucosa oral, empleando métodos in vitro que permitan medir cuánto tiempo permanecen los metabolitos (identificados mediante patrones) en la cavidad bucal tras el enjuague.

BIBLIOGRAFÍA

1. Maldonado C, et al. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura del COVID-19. SciELO [Internet]. Chile; 2020 [citado 2021 Jul 14]. Disponible en: <https://www.scielo.org>
2. Jeldres M, et al. Patogenia y tratamiento de la mucositis asociada a radioterapia y quimioterapia en cáncer de cabeza y cuello. SciELO [Internet]. Chile; 2021 [citado 2021 Jul 14]. Disponible en: <https://www.scielo.org>
3. Fuensanta LC, et al. Valoración de la mucositis secundaria a tratamiento oncohematológico mediante distintas escalas. SciELO [Internet]. España; 2005 [citado 2021 Jul 14]. Disponible en: <https://www.scielo.org>
4. Colegio Profesional de Higienistas Dentales de Madrid. World's Hygienist [Internet]. Madrid: Colegio Profesional; 2019 [citado 2021 Jul 14]. Disponible en: <http://colegiohigienistasmadrid.org/blog/?p=403>
5. Lamelo A. Guías clínicas sobre mucositis en pacientes oncológicos [Internet]. España: Fistera; 2018 [citado 2021 Jul 14]. Disponible en: <https://www.fistera.com/guias-clinicas/mucositis-paciente-oncologico/>
6. Instituto Nacional del Cáncer. Complicaciones orales del tratamiento del cáncer [Internet]. Estados Unidos: National Cancer Institute; 2020 [citado 2021 Jul 19]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol>
7. Navarro P. Mucositis oral: actualización en diagnóstico, prevención y tratamiento. SciELO [Internet]. España; 2021 [citado 2021 Jul 19]. Disponible en: <https://www.scielo.org>
8. Bussmann RW, Sharon D. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía. Trujillo: Graficart; 2015 [citado 2022 May 15]. Disponible en: <https://books.google.com>
9. Bonells JE. Historia del uso de las plantas medicinales [Internet]. España; 2020 [citado 2022 May 15]. Disponible en: <https://jardinessinfronteras.com/2020/05/26/historia-del-uso-de-las-plantas-medicinales/>
10. Camacho LH. Nacimiento de la quimioterapia. Rev Med [Internet]. Colombia; 2020 [citado 2022 May 15]. Disponible en: <https://revistamedicina.net>

11. Farmacia Serra Mandri. Historia de la higiene oral y colutorios [Internet]. España; 2021 [citado 2022 May 05]. Disponible en: <https://www.farmaciaserra.com/blog/historia-higiene-odol-colutorios.html>
12. Ministerio de Salud del Perú. Plantas medicinales tradicionales del Perú [Internet]. Lima: MINSA; 2017 [citado 2022 May 05]. Disponible en: <https://www.gob.pe>
13. Ghandehari K, et al. Antimicrobial activity of herbal extracts against *Streptococcus mutans*: systematic review and meta-analysis. *Avicenna J Phytomed* [Internet]. Irán; 2025 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>
14. Kan Y, Lee J, Kim H, et al. Combined antimicrobial activity of plant extracts for anticariogenic mouthwash. *J Acupunct Meridian Stud* [Internet]. Corea; 2023 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com>
15. Pombo L, et al. Actividad antioxidante y antimicrobiana de *Pelargonium odoratissimum* [Internet]. Colombia: Fundación Universitaria Juan N Corpas; 2016 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://core.ac.uk>
16. Huaman Y, et al. Actividad antibacteriana de extractos vegetales [tesis]. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2016 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://core.ac.uk>
17. Sánchez MT, et al. Comparación del efecto antibacteriano de colutorios bucales [tesis]. Chiclayo: Universidad Señor de Sipán; 2020 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://core.ac.uk>
18. Núñez P, et al. Efecto irritante del gel elaborado con extracto acuoso del mesocarpio de *Hylocereus megalanthus* (Cactaceae) "pitahaya" in vitro mediante método HET-CAM. *SciELO* [Internet]. Perú; 2019 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://www.scielo.org>
19. Claveri A. Efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas de saponinas a partir de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque SACH'A PARACCAY en *Escherichia coli* ATCC 51813 [tesis]. Cusco: UNSAAC; 2023 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://core.ac.uk>
20. Huamani C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% y de un colutorio elaborado de la raíz de *Geranium sessiliflorum* Cav. "Chili chili" frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis para optar el título

- profesional de Químico Farmacéutico [tesis]. Cusco: UNSAAC; 2019 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://core.ac.uk>
21. Jauregui Zela S. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico in vitro de la raíz tuberosa de *Sacha Paraccay* (*Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque) frente a *Malassezia furfur* cepa ATCC 14521 y formulación de shampoo anticapa. [tesis]. Cusco: UNSAAC; 2018 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://core.ac.uk>
 22. Oliveira MM, et al. Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. Dialnet [Internet]. España; 2005 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es>
 23. Santivañez R. Plantas medicinales del Perú [Internet]. Perú; 2013 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://bvs.ins.gob.pe>
 24. Huamantupa R, et al. Uso de plantas medicinales en Cusco. SciELO [Internet]. Perú; 2011 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://www.scielo.org>
 25. Kew Science. Plants of the World Online [Internet]. Reino Unido; 2025 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://powo.science.kew.org>
 26. Aedo C. Taxonomic revision of *Geranium*. Ann Missouri Bot Garden [Internet]. Estados Unidos; 2012 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://www.jstor.org>
 27. World Flora. *Geranium* spp. Flora del Perú y regiones altoandinas. [Internet]. 2025 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <http://www.worldfloraonline.org>
 28. Kew Science. *Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy [Internet]. Plants of the World Online; 2025 [citado 26 dic 2025]. Disponible en: <https://powo.science.kew.org>
 29. World Flora Online. *Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy [Internet]. WFO; 2025 [citado 26 dic 2025]. Disponible en: <http://www.worldfloraonline.org>
 30. Yumei Y, et al. Antibacterial activity of natural alkaloids [Internet]. China; 2021 [citado 2025 Abr 07]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>.
 31. Kuzhuppillymyal L. Los metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos. Biol Soc. 2023;6(12).
 32. Cheng X. Natural phenolic compounds: antimicrobial properties, mechanisms and potential utilization. Food Control [Internet]. 2024 [citado 2026 Abr 20];155:110440. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110440>
 33. Carletto-Körber FP. Identificación, transmisión y homología de *Streptococcus mutans* de la madre durante la gestación y el niño [tesis doctoral]. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba; 2014.

34. Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación [Internet]. 2015 [citado 2026 Abr 20]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5236033.pdf>
35. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* y caries dental. CES Odontol. 2013;26(1). Disponible en: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/2678>
36. Garza-Zaragoza M. Caracterización taxonómica y molecular de *Candida* spp. en pacientes sanos y diabéticos [tesis]. Nuevo León: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2018.
37. British Society for Immunology. *Candida albicans* [Internet]. 2021 [citado 2024 Mar 10]. Disponible en: <https://www.immunology.org/es/public-information/bitesized-immunology/pathogens-and-disease/candida-albicans>
38. Ahmad N, Drew WL, Plorde JJ. *Sherris Microbiología Médica*. 5a ed. México: McGraw-Hill; 2011.
39. Puerto JL. Candidiasis orofaríngea. *Rev Cubana Estomatol*. 2001;38(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072001000400007
40. Wolfgang B. Candidiasis orales: cuadro clínico, epidemiología y etiología. *Rev Med Clin Condes*. 2010;21(10). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864010705406>
41. Carla B. Evaluación del esmalte dental ante agentes externos [tesis]. 2019.
42. Khan S. A review on nanotechnology: properties, applications and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms. *J Mol Liq*. 2022;348. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118798>
43. Caballero CJ. Efecto de la liofilización sobre las características físico-químicas del ají rocoto (*Capsicum pubescens*). *Sci Agropecuaria*. 2017;8(3). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172017000300006
44. Whyte B. The minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics [Internet]. 2024 [citado 2025 Mar 07]. Disponible en: <https://www.bmglabtech.com/en/blog/the-minimum-inhibitory-concentration-of-antibiotics/>

45. Sharma R. Kirby Bauer Disc Diffusion Method for Antibiotic Susceptibility Testing [Internet]. 2023 [citado 2025 Abr 15]. Disponible en: <https://microbenotes.com/kirby-bauer-disc-diffusion/>
46. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008;3(2):163-175. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
47. Stella L. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica.* 2009;(42). Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/2573>
48. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy.* 3rd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.
49. Aulton ME, Taylor KM. *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines.* 5th ed. London: Elsevier; 2018.
50. Marsh P, Martin MV. *Oral Microbiology.* 6th ed. Edinburgh: Elsevier; 2016.
51. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23(2). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
52. Allen LV, Ansel HC. *Pharmaceutical Calculations.* 15th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2020.
53. Carvalho I, Cavaco-Paulo A. Formulation of antimicrobial mouthrinses based on natural products. *Int J Pharm.* 2019;562. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.03.017>
54. iDoctus. Amoxicilina: farmacología [Internet]. 2018 [citado 2025 May 05]. Disponible en: <https://int.idoctus.com/consulta/medicamento/idpa/183/farmacologia>
55. Asociación Española de Pediatría. Nistatina [Internet]. 2015 [citado 2021 Sep 13]. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/nistatina>
56. Batista A. Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AF001 por el método HET-CAM. *VacciMonitor.* 2011;20(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2011000100005
57. Rivas M. Evaluación de irritabilidad por el método HET-CAM [tesis]. 2019.

58. Budai P. HET-CAM test for determining the possible eye irritancy of agricultural chemicals. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2010;75(2).
59. Espinoza E. Actividad antibacteriana de extractos de plantas [Internet]. 2015 [citado 2023 Nov 20]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/323347584.pdf>
60. Instituto Nacional del Cáncer. Citotóxico [Internet]. 2024 [citado 2026 Abr 20]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/citotoxico>
61. Vila Jato JL. *Tecnología Farmacéutica. Vol II.* Madrid: Síntesis; 2001.
62. Villar del Fresno AM. *Farmacognosia General.* Madrid: Síntesis; 1999.
63. Wikipedia. *Streptococcus mutans* [Internet]. 2024 [citado 2026 Abr 20]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus_mutans
64. Cuevas-González M. Tratamiento de la mucositis oral en pacientes oncológicos. *Rev Esp Cirug Oral Maxilofac.* 2015;37(2). Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-05582015000200003
65. Instituto Nacional del Cáncer. La radioterapia y usted [Internet]. 2020 [citado 2026 Abr 20]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/radioterapia-y-usted.pdf>
66. Mendoza L, Medina J. Formulación de un colutorio a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* "Aguaymanto" Y *Equisetum bogotense* Kunth "Cola de Caballo", actividad in-vitro sobre *Streptococcus mutans*. [tesis]. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2022.
67. Condor-Mamani D. Desarrollo de colutorio con *Caesalpinia spinosa* [tesis]. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2014.
68. Moina Gallegos V. Actividad antibacteriana in vitro de colutorios elaborados con aceites esenciales de luma chequen (*feuilleéex mo/ina*) a. gray "arrayán" y *minthostachys spicata* (benth). Epling "yuraq muña" frente a la cepa de *streptococcus mutans* [tesis]. Cusco: UNSAAC; 2021.
69. Lock de Ugaz O. *Investigación fitoquímica.* 2a ed. Lima: Fondo Editorial PUCP; 1994.

70. Vilca OHM. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* [tesis]. Tacna: Universidad Privada de Tacna; 2020.
71. Burguet N. Evaluación del cultivo liofilizado de *Candida albicans*. *Rev Cubana Hig Epidemiol.* 2014;52(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300008
72. Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc [Internet]*. 2008 [citado 15 abr 2025];3(2):214-220. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.521>
73. Zapata-Miranda E. Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica in vitro del extracto hidroalcohólico de *Cestrum hediondium* Dun. “Hierba santa” en bacterias patógenas Gram negativas, Gram positivas y hongos [Tesis de pregrado]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas; 2019 [citado 10 mayo 2025]. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/15432>
74. Caceres-Pedraza I. Eficacia in vitro de colutorios preventivos contra la mucositis de pacientes oncológicos durante y después de la quimioterapia [Tesis de pregrado]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas; 2020 [citado 12 mayo 2025]. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/10341>
75. Vasquez M. Pruebas de sensibilidad o antibiogramas [Internet]. Manual MSD (Versión para profesionales); 2022 [citado 2 mayo 2025]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/diagnóstico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
76. Manyari-Pérez LJ. Evaluación del perfil de seguridad de irritación dérmica in vitro mediante el método HET-CAM y actividad cicatrizante de formulaciones magistrales elaboradas con el extracto hidroalcohólico de las hojas de chupa sangre (*Oenothera rosea* Ait.) [Tesis de pregrado]. Huancayo: Universidad Continental; 2021 [citado 14 mayo 2025]. Disponible en: <https://repositorio.continental.edu.pe/handle/20.500.12394/10415>
77. Wayne WD. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 3ra ed. México D.F.: Editorial Limusa; 1991.

78. Quispe A, et al. Estadística no paramétrica aplicada a la investigación científica con software SPSS, MINITAB Y EXCEL. 2019na ed. Bogotá: Editorial EIDEC; 2019.
79. Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA). Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano [Internet]. Lima: Ministerio de Salud del Perú; 2003 [citado 9 mar 2024]. Disponible en: http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf
80. Gavilaes-Quizhpi E, et al. Determinación de la acción del azufre nanoencapsulado en liposomas aplicado al cultivo in vitro del hongo *Botrytis fabae*. Rev Cien Lab. 2019;21(3).
81. Hernandez-Ramírez E, et al. Estudio etnobotánico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de *Geranium semanii* Peyr (municipio de Ozumba, estado de México). Polibotánica [Internet]. 2018 [citado 20 mayo 2025];(46). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682018000200111
82. Arias M. Perfil fitoquímico y actividad antioxidante de plantas medicinales [Internet]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018 [citado 28 mayo 2023]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/323344909.pdf>
83. Batista A, et al. Evaluación de la irritabilidad en mucosa del adyuvante AF01 por el método de HET-CAM. VaccinMonitor [Internet]. 2011 [citado 15 mayo 2025];20(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2011000100003
84. Bruneton J. Farmacognosia: Fitoquímica, plantas medicinales. 2da ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 2001.

ANEXO

ANEXO 1. Formato de recolección y secado de la muestra vegetal

GENERALIDADES	NOMBRE DE LA PLANTA	Chili chili (<i>G. ruizzii</i>)	Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)
	FECHA		
	HORA		
	LUGAR DE RECOLECCION		
	NOMBRE DEL RECOLECTOR		
RECOLECCION	CARACTERISTICAS DE LA PLANTA		
	PARTE DE LA PLANTA A RECOLECTAR		
	CANTIDAD A RECOLECTAR		
SECADO	FECHA DE INICIO DE SECADO		
	LUGAR DE SECADO		
OBSERVACIONES			

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANEXO 2. Formato del porcentaje de humedad

MUESTRA VEGETAL	Chili chili (<i>G. ruizii</i>)				Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)			
	PESO DE LA PLANTA FRESCA	PESO DE LA PLANTA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD	PESO DE LA PLANTA FRESCA	PESO DE LA PLANTA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
1								
2								
3								

Fuente: Villar del Fresno, Ángel M. Farmacognosia General (62)

ANEXO 3. Formato de pruebas de solubilidad del extracto alcohólico al 70% del Chili chili (*G. ruizii*) y Sacha paraccay (*C. parviflora*)

SOLVENTE	MUESTRA VEGETAL	
	Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)
Agua destilada		
Acetona		
Cloroformo		
Etanol 70%		
Etanol 96%		
Hexano		
Metanol		
NaCl		

Fuente: Villar del Fresno, Ángel M. Farmacognosia General (62)

Leyenda:

- Muy soluble: + + +
- Soluble: + +
- Poco soluble: +
- Insoluble: -

ANEXO 4. Formato de análisis fitoquímico cualitativo del extracto alcohólico al 70% del Chili chili (*G. ruizii*) y Sacha paraccay (*C. parviflora*)

PRUEBAS	MUESTRA VEGETAL	
	Extracto alcohólico del Chili chili (<i>G. ruizii</i>)	Extracto alcohólico del Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)
Alcaloides		
Azucares reductores		
Saponinas		
Flavonoides		
Quinonas		
Taninos		
Aminoácidos		

Fuente: Jean Brunetón. Farmacognosia. Fitoquímica de plantas medicinales. (84)

LEYENDA:

- Abundante cantidad +++
- Regular cantidad ++
- Poca cantidad +
- Ausencia –

ANEXO 5. Formato de recolección de datos sobre halos de inhibición de los extractos alcohólicos al 70%

DATOS GENERALES	CEPA ATCC									
	FECHA									
	LUGAR									
DATOS DE HALOS DE INHIBICION	N°	Concentración del extracto alcohólico	Extracto alcohólico al 70% de Chili chili (<i>G. ruizi</i>)			Extracto alcohólico al 70% de Sacha paraccay (<i>C. parviflora</i>)				
			I (mm)	II (mm)	III (mm)	PROMEDIO (mm)	I (mm)	II (mm)	III (mm)	PROMEDIO (mm)
	1									
	2									
	3									
	4									
	5									
	6									
	7									
	8									
9										
10										

Fuente: Datos experimentales del estudio

LEYENDA:

- I: Número de prueba
- II: Número de prueba
- III: Número de prueba

ANEXO 6. Formato de recolección de datos sobre halos del colutorio elaborado con el extracto alcohólico y colutorios comerciales

COLUTORIOS		ACCION ANTIBACTERIANA					ACCION FUNGICA				
		ELABORADOS				COMERCIAL	ELABORADOS				COMERCIAL
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
CARACTERES ORGANOLÉPTICOS	Sabor										
	Color										
	Olor										
	Aspecto										
CARACTERES FISICOQUÍMICOS	Densidad										
	pH										
DATOS DE HALOS DE INHIBICION	I (mm)										
	II (mm)										
	III (mm)										
	PROMEDIO (mm)										

Fuente: Datos experimentales del estudio

LEYENDA:

- A: Colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de Chili Chili (*G. ruizii*).
- B: Colutorio elaborado con extracto alcohólico al 70% de Sacha Paraccay (*C.parviflora*).
- C: Colutorio elaborado con 50% de extracto alcohólico de Chili Chili (*G. ruizii*) y 50% de extracto alcohólico de Sacha Paraccay (*C.parviflora*).
- D: Colutorio con principio activo de Clorhexidina digluconato y Cetilpiridinio (Bucoxidina 0.05%)
- E: Colutorio con principio activo de Clorhexidina (Perio- Aid®)

ANEXO 7. Prueba de irritación por el método HET - CAM

MACROSCOPICA				
COLUTORIO	HUEVOS	INDICE DE IRRITABILIDAD		
		Tiempo de aparición de hemorragia	Tiempo de aparición de lisis	Tiempo de aparición de coagulación
A	1			
	2			
	3			
B	1			
	2			
	3			
C	1			
	2			
	3			

Fuente: Datos experimentales del estudio

LEYENDA:

A: colutorio elaborado con el extracto alcohólico al 70% de de Chili Chili (*G. ruizii*).

B: colutorio elaborado con el extracto alcohólico al 70% de Sacha Paraccay (*C.parviflora*).

C: colutorio elaborado con 50% de extracto alcohólico de Chili Chili (*G. ruizii*) y 50% de extracto alcohólico de Sacha Paraccay (*C.parviflora*).

ANEXO 8. Identificación de las plantas por el Herbario Vargas Cuz



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- **APARTADO POSTAL**
N° 921 - Cusco - Perú
- **FAX:** 238156 - 238173 - 222512
- **RECTORADO**
Calle Tigris N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 - 254398
- **CIUDAD UNIVERSITARIA**
Av. De la Cultura N° 733 - Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226
- **CENTRAL TELEFÓNICA:** 232398 - 252210 - 243835 - 243836 - 243837 - 243838
- **LOCAL CENTRAL**
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 327571 - 225721 - 224015
- **MUSEO INKA**
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono: 237380
- **CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA**
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 277145 - 277246
- **COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"**
Av. De la Cultura N° 721
"Estudio Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 02-2023-HVC-FCB-UNSAAC

La Directora del Herbario Vargas CUZ, Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: las estudiantes **Dania Edith Mamani Coaquira** con DNI 76181108 y **Claudia Verónica Santander Ramirez** con DNI 75743459 Bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; han presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ, dos muestras botánicas para su determinación taxonómica (expediente N° 503834), para realizar el proyecto de tesis "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFUNGICA IN VITRO DE UN COLUTORIO ELABORADO CON EXTRACTO ALCOHOLICO DE CHILI CHILI (*Geranium filipes* Killip) y SACHA PARACCAY (*Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque) SOBRE CEPAS DE *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*", las que al ser diagnosticadas por el Mgt. Abel Monteagudo Mendoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del herbario, concuerdan con las siguientes especies; de acuerdo a la clasificación del Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE LOCAL
1	Nyctaginaceae	<i>Colignonia parviflora</i> (Kunth) Choisy	"sacha paraccay"
2	Geraniaceae	<i>Geranium ruizii</i> Hieron. vel sp. aff.	"chili chili"

Se le expide la presente certificación a petición formal de las interesadas, para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 23 de enero de 2023

Blga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas Cuz




ANEXO 9. Certificado de la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC 27175



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Streptococcus mutans</i> Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-34** Reference Number: ATCC® 25175™* Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2023/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Madison C Vogt Release Date: 2021/9/16
--	---

Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	Performance Medium: SBAP
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains	Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE
---	--

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

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




ANEXO 10. Certificado de la cepa *Candida albicans* ATCC 10231



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-1359** Reference Number: ATCC® 10231™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2024/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kassandra L Hall Release Date: 2022/3/24
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamyospore production: positive  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

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



ANEXO 11. Certificado del análisis microbiológico de los extractos de las plantas estudiadas



LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA "SISLAB"
"Discreción Eficiencia e Investigación"

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE EXTRACTOS ALCOHÓLICOS

PRODUCTOS:

- Extracto alcohólico de CHILI CHILI (*Geranium filipes* Killip)
- Extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (*Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque)

SOLICITANTES:

- Bach. Dania Edith Mamaní Coaquira
- Bach. Claudia Verónica Sanlander Ramírez

LUGAR Y FECHA: Cusco 15 de Noviembre del 2023

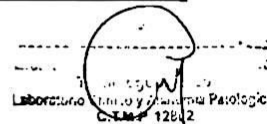
INDICADORES MICROBIOLÓGICOS:

1. **Criterio imperativo:** Presencia de *Salmonella* Spp (Agar SS).
2. **Criterio indicativo de higiene:** Presencia de Coliformes fecales – *Escherichia Coli* (Agar Mc Conkey).
3. **Criterio de alerta o límites críticos:**
 - Recuento de microorganismo Aerobios Mesófilos Viables (Agar Plate Count).
 - Recuento de Hongos y Levaduras (Agar Sabouraud).

REPORTE DE RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE EXTRACTO ALCOHÓLICO DE CHILI CHILI (*Geranium filipes* Killip)

CRITERIOS	RESULTADOS	LÍMITES MICROBIOLÓGICOS PERMISIBLES (LMP)	OBSERVACIONES
Criterio imperativo	Negativo	Ausencia de <i>Salmonella</i> Spp	El extracto alcohólico de CHILI CHILI (<i>Geranium filipes</i> Killip) cumple con los LMP.
Criterio indicativo de higiene	Negativo	Ausencia de <i>Escherichia Coli</i>	El extracto alcohólico de CHILI CHILI (<i>Geranium filipes</i> Killip) cumple con los LMP.
Criterio de alerta o límites críticos	Negativo (<10 ⁻² UFC)	10 ⁻⁴ - 10 ⁻¹ UFC	El extracto alcohólico de CHILI CHILI (<i>Geranium filipes</i> Killip) cumple con los LMP.
	Negativo (10 ⁻² UFC)	10 ⁻² - 10 ⁻³ UFC	El extracto alcohólico de CHILI CHILI (<i>Geranium filipes</i> Killip) cumple con los LMP.

Brando Dino Salcedo Ramos
 Laboratorio Clínico Y Anatomía Patológica



DIRECCION POSTAL Av. la Cultura N° 1400 Of 102 Wanchaq - CUSCO
 TELEFONOS : TEL 084 265241 RPC 942 727417, 944 214527 , Correo Electrónico sislab@gmail.com



REPORTE DE RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE EXTRACTO ALCOHÓLICO DE SACHA PARACCAY (*Collignonia parviflora* var. *blumbellata* Rafinesque)

CRITERIOS	RESULTADOS	LIMITES MICROBIOLÓGICOS PERMISIBLES (LMP)	OBSERVACIONES
Criterio Imperativo	Negativo	Ausencia de <i>Salmonella</i> Spp	El extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (<i>Collignonia parviflora</i> var. <i>blumbellata</i> Rafinesque) cumple con los LMP.
Criterio Indicativo de higiene	Negativo	Ausencia de <i>Escherichia Coli</i>	El extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (<i>Collignonia parviflora</i> var. <i>blumbellata</i> Rafinesque) cumple con los LMP.
Criterio de alerta o límites críticos	Negativo (<10 ⁻² UFC)	10 ⁻¹ - 10 ⁻¹ UFC	El extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (<i>Collignonia parviflora</i> var. <i>blumbellata</i> Rafinesque) cumple con los LMP.
	Negativo (10 ⁻² UFC)	10 ⁻² - 10 ⁻³ UFC	El extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (<i>Collignonia parviflora</i> var. <i>blumbellata</i> Rafinesque) cumple con los LMP.

CONCLUSIÓN:

Las muestras de extractos alcohólicos de CHILI CHILI (*Geranium filipes* Killip) y SACHA PARACCAY (*Collignonia parviflora* var. *blumbellata* Rafinesque) no presentan microorganismos patógenos, indicando la adecuada higiene en el proceso de maceración de los extractos alcohólicos desde el punto de vista microbiológico.

Brando Dino Salcedo Ramos
 Laboratorio Clínico Y Anatomía Patológica



Brando Dino Salcedo Ramos
 Laboratorio Clínico Y Anatomía Patológica

ANEXO 12. Certificado del análisis microbiológico de los colutorios elaborados



LABORATORIO CLINICO Y ANATOMIA PATOLOGICA "SISLAB"
"Discreción Eficiencia e Investigación"

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE COLUTORIOS ELABORADOS

PRODUCTOS:

- Colutorio de extracto alcohólico de CHILI CHILI (*Geranium filipes* Killip)
- Colutorio de extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (*Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque)
- Colutorio de extracto alcohólico de CHILI CHILI (*Geranium filipes* Killip) y extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (*Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque)

SOLICITANTES:

- Bach. Dania Edith Mamani Coaquira
- Bach. Claudia Verónica Santander Ramirez

LUGAR Y FECHA: Cusco 15 de Noviembre del 2023

REPORTE DE RESULTADOS:

COLUTORIOS	CRITERIOS BACTERIOLÓGICOS			
	Staphylococcus aureus UFC/1ml	Pseudomonas aeruginosa UFC/1ml	Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas UFC/ml	Coliformes totales
Extracto alcohólico de CHILI CHILI (<i>Geranium filipes</i> Killip)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (<i>Colignonia parviflora</i> var. <i>biumbellata</i> Rafinesque)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Extracto alcohólico de CHILI CHILI (<i>Geranium filipes</i> Killip) y extracto alcohólico de SACHA PARACCAY (<i>Colignonia parviflora</i> var. <i>biumbellata</i> Rafinesque)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

CONCLUSIÓN:

Los colutorios de los extractos alcohólicos de CHILI CHILI (*Geranium filipes* Killip) y SACHA PARACCAY (*Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque) no presentan microorganismos patógenos indicando la adecuada higiene en el proceso elaboración de los colutorios. Los resultados se encuentran dentro de los límites de aceptación de los criterios de alerta - límites críticos e indicativos de higiene aprobados por el Ministerio de Salud-Resolución Ministerial N°615-2003-SA/DM.



DIRECCION POSTAL Av. la Cultura N° 1400 Of 102 Wanchaq - CUSCO
TELEFONOS : TEL 084 265241 RPC 942 727417, 944 214527 , Correo Electrónico sislab@gmail.com

Brando Dino Salcedo Ramos

Laboratorio Clínico Y Anatomía Patológica

ANEXO 13. Certificado de los huevos usados para la prueba de irritación por el método HET-CAM





S.R.L CLINICAL AND BIOLOGICAL LABORATORY

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONOMICA N°CB0041 – 24

El gerente de Clinical and Biological Laboratory, deja constancia de que; las estudiantes **Dania Edith Mamani Coaquira** con DNI 76181108 y **Claudia Verónica Santander Ramírez** con DNI 75743459 Bachilleres de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, egresadas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; han presentado a la Dirección del laboratorio "CB LAB", muestras avícolas para su determinación taxonómica, del proyecto de tesis "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIFUNGICA IN VITRO DE UN COLUTORIO ELABORADO CON EXTRACTO ALCOHOLICO DE *Geranium ruzii* Hieron. *Vel sp. aff.* "CHILI CHILI" Y *Colligonla parviflora* (Kunth) Choisy "SACHA PARACAY" SOBRE CEPAS DE *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*", las que al ser diagnosticadas por la Mgt. Martha Vanessa Fernanda Baca Campos, utilizando claves dicotómicas, consultada con bibliografía especializada. (NADAL & et al., 2009.).

N°	FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE LOCAL
1	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i>	"gallina de corral"

Se le extiende la presente certificación a petición de las interesadas, para los fines que viera por conveniente.

MARtha Vanessa Fernanda Baca Campos
BIÓLOGA
CBP. 12804

Mgt. Martha Vanessa Fernanda Baca Campos

BIOLOGA

ANEXO 14. Agar Sangre

Uso:

Es un medio de cultivo utilizado para aislar microorganismos exigentes y con reacciones de hemólisis, esto al ser suplementado con sangre ovina.

Fundamento:

- La infusión de músculo de corazón y la peptona, otorgan al medio un alto valor nutritivo, que permite el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, aún de aquellos nutricionalmente exigentes.
- El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante.
- El agregado de 5-10 % sangre ovina desfibrinada estéril promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

Fórmula (de gramos en litros):

Infusión de musculo de corazón: 375.0

Peptona: 10.0

Cloruo de sodio: 5.0

Agar: 15.0

pH final: 7.3± 0.2

Nota: la infusión de músculo de corazón es equivalente a 10 g de polvo.

Instrucciones:

Suspender 40 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar reposar 5 minutos y mezclar perfectamente hasta obtener una suspensión homogénea. Calentar con agitación frecuente y hervir 1 minuto para disolución total. Esterilizar a 121 °C durante 20 minutos.

Preparación de agar sangre:

1. Agregar 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C.
2. Homogenizar y distribuir en placas Petri esterilizados.

Fuente: britanialab.com

ANEXO 15. Caldo Muller Hinton

Usos:

Es un test de sensibilidad para determinar la concentración mínima inhibitoria de bacterias aisladas. También se desarrolló para el cultivo de Neisseria patógena y otros microorganismos exigentes. Tiene la misma fórmula que el Agar Mueller Hinton pero puede usarse cuando se prefiere el medio fluido. El Caldo Mueller Hinton tiene los cationes de calcio, magnesio, manganeso y zinc ajustados de acuerdo con la Norma ISO 16782. La infusión de carne y la peptona de caseína ácida (H) proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El almidón en el medio actúa como un factor de crecimiento, probablemente funciona como un protector coloidal, y neutraliza los productos tóxicos que se forman durante el desarrollo de los organismos.

Fórmula de gramos sobre litros:

Peptona de caseína ácida:17.5

Infusión de carne: 2

Fécula de maíz: 1.5

Preparación:

Suspender 21 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disuelva calentando con agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. NO SOBRECALENTAR.

Fuente: condalab.com

ANEXO 16. Agar Muller Hinton

Uso:

Medio de cultivo recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos.

Fundamento:

- Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano.
- Presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad.
- El contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo.
- La mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente.
- Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigentes en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio evidencia científica que avala el uso de este medio de cultivo.

Composición:

Infusión de carne: 300.0

Peptona ácida de caseína: 17.5

Almidón: 1.5

pH final: 7.3 ± 0.1

Nota: la infusión de carne 300 g es equivalente a 3 g de polvo.

Instrucciones:

Suspender 22 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto para disolución total. Distribuir en tubos o en otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Fuente: britanialab.com

ANEXO 17. Caldo BHI

Uso:

Medio sólido apropiado para el cultivo de bacterias y hongos, incluyendo los de difícil desarrollo.

Fundamento:

Es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer. El agar es el agente solidificante.

El agar cerebro corazón mantiene los mismos principios que el cal- do para el cultivo de estreptococos y otras bacterias exigentes. Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril o con sangre equina desfibrinada estéril, permitiendo así el desarrollo de hongos de difícil crecimiento. Con el agregado de 10% de sangre de caballo desfibrinada, fue utilizado para el crecimiento de *Histoplasma capsulatum* y de hongos patógenos.

Por tratarse de un medio que contiene glucosa, no es un agar sangre apropiado para la observación de reacciones de hemólisis, con el agregado de 20 UI de Penicilina y 40 µg/ml de estreptomycin, se utiliza este medio para el aislamiento selectivo de hongos patógenos.

Fórmula (en gramos por litro):

Infusión de cerebro de ternera: 200.0

Infusión de corazón: 250.0

Peptona: 10.0

Cloruro de sodio: 5.0

Glucosa: 2.0

Fosfato disódico: 2.5

Agar: 15.0

pH final: 7.4 ± 0.2

Instrucciones:

Disolver 52 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta su disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Incubación:

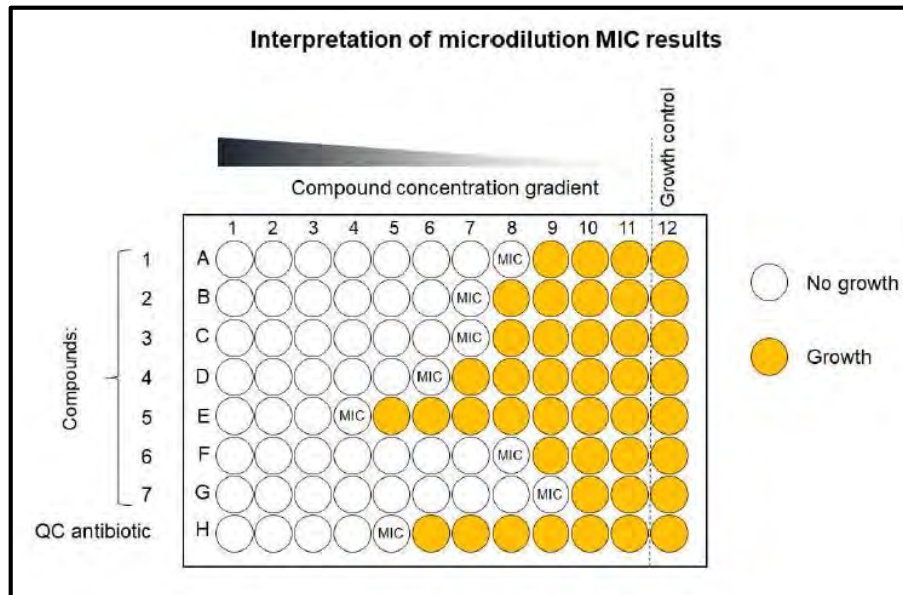
El tiempo, la temperatura, y la atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.

En general se recomienda:

Bacterias de fácil crecimiento: en aerobiosis, a 35-37 ° C durante 18 a 24 horas.

Fuente: britanialab.com

ANEXO 18. Método de microdilución



La actividad antimicrobiana se evaluará mediante la determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) utilizando el método de microdilución descrito por Wiegand et al. (2008). A una placa de 96 pozos, se agregará 50 UL del extracto de compuestos fenólicos de cada hongo (diluido en medio Mueller-Hinton), a concentraciones que varían entre 200 a 0.39 mg/mL. Luego, se agregará 50 µl de la suspensión bacteriana en medio Mueller-Hinton (alrededor de 10⁵ UFC/mL). Las microplacas se incubarán a 37 °C durante 18 a 20 h. La MIC se definirá como la concentración más baja que inhiba el crecimiento microbiano. Se utilizará cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (0.2 mg/mL) para evaluar el cambio de color del medio (de incoloro a rosado), lo que indica crecimiento bacteriano (se agregará 50 ul y se incubará por 30 min). El antibiótico utilizado como referencia será amoxicilina (concentración inicial 64 mg/L). Todos los ensayos se realizarán por triplicado.

Fuente: Ivan best (Actividad antimicrobiana in vitro en *Agaricus* ssp. Y *Pleurotus* spp)

ANEXO 19. Archivo fotográfico

Fotografía N° 1



Especie vegetal Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*).

Fotografía N° 2



Especie vegetal Sacha Paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*).

Fotografía N° 3



Recolección de la especie vegetal Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*).

Fotografía N° 4



Recolección de la especie vegetal Sacha Paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*).

Fotografía N° 5



Ubicación geográfica del distrito de Ancahuasi donde se realizó la recolección de las especies vegetales.

Fotografía N° 6



Secado de la especie vegetal Chili chili
(*Geranium ruizii* Hieron. vel sp. aff.).

Fotografía N° 7



Secado de la especie vegetal Sacha Paraccay
(*Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy).

Fotografía N° 8



Molienda de la especie vegetal
(*Geranium ruizii* Hieron. vel sp. aff.).

Fotografía N° 9



Molienda de la especie vegetal Sacha Paraccay
(*Colignonia parviflora* (Kunth) Choisy).

Fotografía N° 10



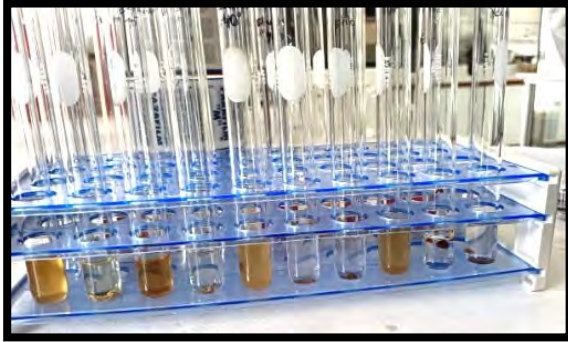
Maceración de las especie vegetales.

Fotografía N° 11



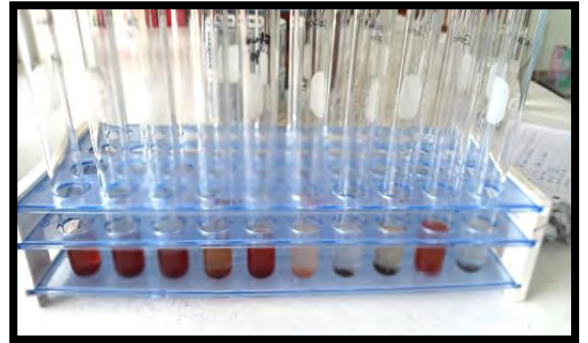
Método de baño María para extracción
de la melasa.

Fotografía N° 12



Pruebas de solubilidad del Chili chili (*Geranium ruizii Hieron. vel sp. aff.*) en agua, metanol, etanol 40°, etanol 70, etanol 96, acetato de etil, acetón, cloroformo, éter etílico, bencina y hexano.

Fotografía N° 13



Pruebas de solubilidad del Sacha Paraccay (*Colignonia parviflora (Kunth) Choisy*) en agua, metanol, etanol 40°, etanol 70, etanol 96, acetato de etil, acetón, cloroformo, éter etílico, bencina y hexano.

Fotografía N° 14



Activación de la cepa (*S. mutans*) y sembrado en Agar sangre.

Fotografía N° 15



Activación de la cepa (*C. albicans*) y sembrado en Agar sabouraud.

Fotografía N° 16



Crecimiento de la bacteria (*S. mutans*) en el agar.

Fotografía N° 17



Crecimiento del hongo (*C. albicans*) en el agar.

Fotografía N° 18



Microdilucion (CMI)

- Fila B, C, D y E: Concentraciones de extracto *G. ruizii* (256, 128, 64, 32, 13, 14, 12 y 10 mg/uL)
- Pozos 2, 3 y 4 (G): Patrón (Amoxicilina).
- Pozos 6, 7 y 8 (G): Control positivo
- Pozos 9, 10 y 11 (G): Control negativo

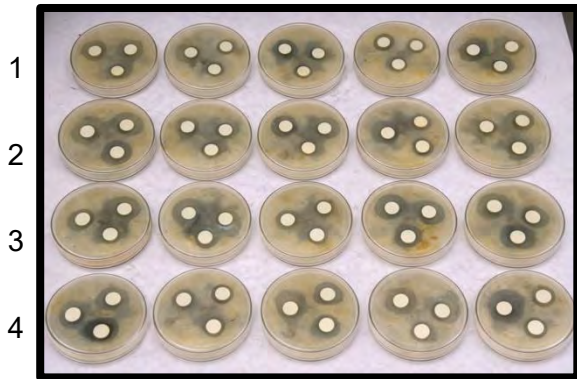
Fotografía N° 19



Microdilucion (CMI)

- Fila B, C, D y E: Concentraciones de extracto *C. parviflora* (256, 128, 64, 32, 13, 14, 12 y 10 mg/uL)
- Pozos 2, 3 y 4 (G): Patrón (Nistatina).
- Pozos 6, 7 y 8 (G): Control positivo
- Pozos 9, 10 y 11 (G): Control negativo

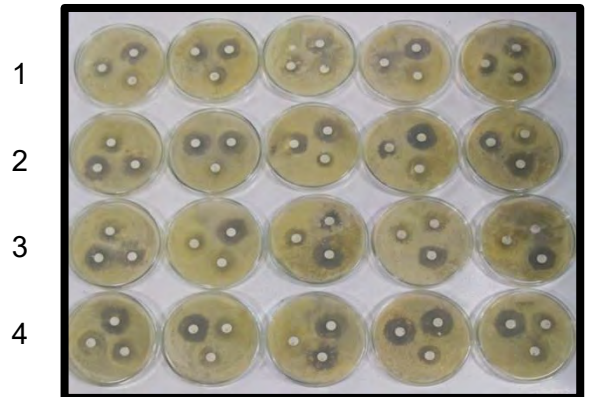
Fotografía N° 20



Halos de inhibición de las concentraciones del extracto alcohólico de *G. ruizii* (Chili chili)

- Fila 1: 14 µg/mL
- Fila 2: 16 µg/mL
- Fila 3: 32 µg/mL
- Fila 4: Amoxicilina 64 mg/L

Fotografía N° 21



Halos de inhibición de las concentraciones del extracto alcohólico de *C. parviflora* (Chili chili)

- Fila 1: 16 µg/mL
- Fila 2: 32 µg/mL
- Fila 3: 64 µg/mL
- Fila 4: Nistatina: 64 mg/L

Fotografía N° 22



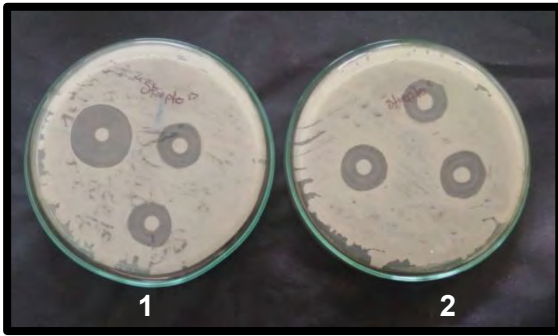
Elaboración del colutorio.

Fotografía N° 23



- Colutorio 1: Combinación del extracto de Chili chili y Sacha paraccay.
- Colutorio 2: Extracto puro de Chili chili.
- Colutorio 3: Extracto puro de Sacha paraccay.

Fotografía N° 24



- 1: Halos de inhibición del Perio Aid (colutorio patrón) frente a *S. mutans*
- 2: Halos de inhibición del colutorio elaborado con la combinación de Chili chili y Sacha paraccay frente a *S. mutans*

Fotografía N° 25



- 1: Halos de inhibición del colutorio elaborado con la combinación de Chili chili y Sacha paraccay frente a *C. albicans*
- 2: Halos de inhibición de la Bucoxidina (colutorio patrón) frente a *C. albicans*

Fotografía N° 26



Cámara de incubación de los huevos

Fotografía N° 27



Prueba de ovoscopia para la evaluación de huevos fértiles

Fotografía N° 28



Membrana corioalantoidea (CAM) y su red vascular después de la exposición a los colutorios.