

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA



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 Y EVALUACIÓN DE LA IRRITABILIDAD DE LA
MUCOSA ORAL

Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico
presentado por:

Br. Mendoza Medina Luis Jeffersson
Br. Quispe Gutiérrez Maybé Tatiana

Asesora:
Dra. Carla del Carpio Jiménez

Cusco, 2022

DEDICATORIA

A mis Padres Lourdes y David, por haberme formado como la persona que soy, por todo su apoyo y amor incondicional, su confianza brindada, por las fuerzas que me dieron para nunca rendirme para así cumplir cada una de mis metas, por su arduo trabajo y sacrificio en todos estos años que permitió que llegue hasta aquí. Me siento orgullosa y privilegiada de ser su hija, porque son unos magníficos padres y mi mayor inspiración, cada uno de mis logros se los debo a ustedes incluido este.

A mi hermana, por acompañarme siempre, por todo su amor, confianza, cariño y por el apoyo moral, que me dio en todo este camino recorrido.

A toda mi familia, tíos, primos, sobrinos, amigos y compañeros Por apoyarme en cada decisión tomada y mis proyectos trazados.

Maybé Tatiana Quispe Gutiérrez

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por bendecirme la vida, por guiarme y ser mi fuerza en momentos difíciles de afrontar en donde no es permitido rendirme.

Agradecer a mis padres por ser los principales iniciadores de mis sueños y metas, por creer en mí y lo que soy capaz de lograr sin rendirme, por todos los consejos y principios que me han inculcado.

Agradecer a nuestra asesora Dra. Carla Del Carpio Jiménez por su paciencia, preocupación, su tiempo, su apoyo y por todas las enseñanzas brindadas durante el desarrollo de la tesis y en todos los años dentro de la universidad. De igual manera a todos los docentes de la Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por todos sus conocimientos compartidos a lo largo de mi preparación profesional.

A mi compañero de tesis, Luis Mendoza, por su paciencia, comprensión y por todo su apoyo durante la realización de la tesis y todos los años universitarios, por su sincera amistad, lealtad que siempre demostró y por ser una magnífica persona.

Asimismo, agradecer a Q.F. Vladimir, la Blga. Jossary Jheremyl Medina Hurtado, al técnico en laboratorio patológico, Harol Fuentes Borda, que nos brindaron su apoyo con la realización de esta tesis.

Maybé Tatiana Quispe Gutiérrez

DEDICATORIA

A mi papá Clever Mendoza Achaya, gracias por tu esfuerzo, tu sacrificio, tu apoyo, la confianza depositada en mí, por tus sabios consejos papino, por tu aliento que siempre estuvo presente, desde el primer día de mi vida, que han sido de gran ayuda, por hacer de mi lo que soy ahora, muchas gracias papá.

A mi mamá María Medina Valer, por su apoyo, su cariño, su amor, su dedicación y por tu sacrificio mamita, tus consejos que lograron forjar una excelente persona, la paciencia que demostraste en cada momento difícil que pasamos, muchas gracias mamita.

A mi hermano Clever Jeanpaul Mendoza Medina, por su confianza, su apoyo su aliento, su lealtad, su respeto, por la forma de demostrar su amor, gracias maní manito.

A mi mamita Flora Valer de Medina, gracias por cuidarme, por protegerme, gracias por todo mamá Flora.

A toda mi familia mis abuelos, tíos, tías, primos, primas y a mis amigos, por alentarme desde el primer día de universidad hasta terminarla, gracias a todos.

Luis Jeffersson Mendoza Medina

AGRADECIMIENTO

A Diosito a la Virgencita Asunta, por darnos salud y vida cada día, por permitirme llegar y cumplir mis metas.

A mi asesora Dra. Carla Del Carpio Jiménez por brindarnos su apoyo, en todo momento de la realización de la tesis, por las enseñanzas los conocimientos adquiridos mediante ella, desde las aulas universitarias, mil gracias, Dra. Carla.

A los doctores de la Escuela Profesional De Farmacia Y Bioquímica y demás docentes por brindarnos sus conocimientos, que al día de hoy forman parte de nuestro desarrollo profesional y personal.

A mi compañera de tesis Maybe Quispe Gutiérrez, por ser una excelente persona, por el apoyo, la confianza, desde la universidad, hasta la conclusión de la tesis.

A la Blga. Jossary Jheremyl Medina Hurtado, al técnico en laboratorio patológico, Harol Fuentes Borda, gracias por vuestro tiempo, apoyo al momento de la realización de la tesis, gracias primitos.

Luis Jeffersson Mendoza Medina

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
ÍNDICE DE TABLAS	XII
ÍNDICE DE FIGURAS	XV
ÍNDICE DE GRAFICOS	XV
INDICE DE FLUJOGRAMAS.....	XVI
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY	XVIII
ABREVIATURAS	XIX
INTRODUCCIÓN	XX

CAPITULO I ASPECTOS GENERALES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	2
1.4 JUSTIFICACIÓN	3
1.5 HIPOTESIS.....	4

CAPITULO II MARCO TEORICO Y CONCEPTUAL

2.1 VISION HISTORICA.....	5
2.2 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO.....	6
2.2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES.....	6
2.2.2 ANTECEDENTES NACIONALES	9
2.2.3 ANTECEDENTES LOCALES	12
2.3 ESTADO DEL ARTE	14
2.4 BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	15

2.4.1	ESPECIE VEGETAL <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”	15
2.4.1.1	CARACTERÍSTICAS	15
2.4.1.2	CULTIVO.....	16
2.4.1.3	DISTRIBUCIÓN	17
2.4.1.4	USOS DEL AGUAYMANTO.....	17
2.4.1.5	PROPIEDADES.....	17
2.4.1.6	COMPOSICIÓN QUÍMICA	17
2.4.2	ESPECIE VEGETAL <i>Equisetum bogotense</i> kunth “COLA DE CABALLO” ..	18
2.4.2.1	CARACTERÍSTICAS	18
2.4.2.2	HABITAT	19
2.4.2.3	DISTRIBUCIÓN	19
2.4.2.4	USOS DE COLA DE CABALLO	20
2.4.2.5	PROPIEDADES.....	20
2.4.2.6	COMPOSICIÓN QUÍMICA	20
2.5	CAVIDAD BUCAL.....	20
2.6	BIOFILM BUCODENTAL	21
2.7	CARIES DENTAL.....	21
2.7.1	DEFINICIÓN	21
2.7.2	SIGNOS Y SÍNTOMAS.....	21
2.7.3	CAUSAS.....	22
2.7.4	TIPOS.....	22
2.8	MICROORGANISMOS RELACIONADOS A LA CARIES DENTAL	22
2.8.1	STREPTOCOCCUS MUTANS:.....	22
2.8.1.1	CARACTERÍSTICAS	23
2.8.1.2	MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS EN CULTIVO	23
2.8.1.3	RECURSOS METABOLICOS	23
2.8.1.4	MEDIO DE CULTIVO.....	24
2.9	CRECIMIENTO BACTERIANO.....	24
2.10	CURVA DE CRECIMIENTO.....	24
2.11	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA.....	25
2.12	COLUTORIO.....	26
2.12.1	CARACTERÍSTICAS	26
2.12.2	TIPOS	27
2.12.3	OBJETIVOS	27

2.13 FORMA DE ELABORACIÓN	28
2.14 CONTROL DE CALIDAD DEL COLUTORIO ELABORADO	29
2.15 COLUTORIO CONTROL	30
2.16 IRRITABILIDAD	30
2.17 HISTOLOGÍA	31

CAPITULO III MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	36
3.1.1 MATERIAL VEGETAL	36
3.1.2 MATERIAL ANIMAL	36
3.1.3 MATERIAL MICROBIANO	36
3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO.....	36
3.2.1 MATERIALES DE CAMPO	36
3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO.....	36
3.2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO	37
3.2.4 SOLVENTES Y REACTIVOS	37
3.2.5 MEDIOS DE CULTIVO	37
3.2.6 INSUMOS	38
3.2.7 OTROS MATERIALES	38
3.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
3.3.1 DISEÑO METODOLÓGICO.....	38
3.3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	38
3.3.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	38
3.3.2 DISEÑO DE PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE Streptococcus mutans ATCC 25175 FRENTE A LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.....	39
3.3.3 DISEÑO DE PRUEBA DE LA ACTIVIDAD IN-VITRO SOBRE Streptococcus mutans ATCC 25175 DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO POR MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.....	40
3.3.4 DISEÑO DE PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE Streptococcus mutans ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO CON	

LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS POR EL MÉTODO DE KIRBY BAUER.....	41
3.3.5 EVALUAR LA IRRITACIÓN DE LA MUCOSA ORAL.....	42
3.4 DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	43
3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS	43
3.4.1.1 VARIABLES INDEPENDIENTES	43
3.4.1.2 VARIABLES DEPENDIENTES.....	43
3.4.2 VARIABLES NO IMPLICADAS	51
3.4.2.1 VARIABLES INTERVINIENTES	51
3.4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	52
3.4.3.1 CRITERIO DE INCLUSIÓN.....	52
3.4.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	52
3.4.4 PROCEDIMIENTO	53
3.4.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL	55
3.4.4.1.1. ADQUISICIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL.....	55
3.4.4.1.2. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y SECADO.....	55
3.4.4.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.....	55
3.4.4.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis</i> peruviana “AGUAYMANTO” y <i>Equisetum bogotense</i> kunth “COLA DE CABALLO”	56
3.4.4.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DEL FRUTO DE AGUAYMANTO Y LAS RAMAS DE COLA DE CABALLO.....	57
3.4.4.5. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA	59
3.4.4.5.1. MÉTODO DE KIRBY BAUER.....	59
3.4.4.5.2. PRUEBA CON EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO.....	59
3.4.4.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA ...	61
3.4.4.6.1. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.....	61
3.4.4.6.2. PRUEBA CON EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO.....	62
3.4.4.7. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO, ELABORADO CON EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO.	64
3.4.4.7.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS	66
3.4.4.7.2. PRUEBA CON EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO.....	67

3.4.5	CONTROL DE CALIDAD DEL COLUTORIO.....	68
3.4.5.1	CONTROL DE CALIDAD ORGANOLÉPTICO	68
3.4.5.2	CONTROL DE CALIDAD FISICO DEL COLUTORIO ELABORADO	68
3.4.5.3	CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO	69
3.4.6	PRINCIPIOS GENERALES PARA EL CUIDADO ANIMAL	70
3.4.7	DETERMINACION DE LA IRRITABILIDAD DE LA MUCOSA ORAL	71
3.4.8	ESTUDIO HISTOPATOLOGICO.....	73
3.4.8.1	PROCEDIMIENTO.....	75
3.4.9	TECNICA DE RECOLECCION DE DATOS.....	76
3.4.9.1	INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS.....	76
3.4.10	TECNICAS PARA PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LA INFORMACION.....	76

CAPITULO IV ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1.	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	78
4.1.1.	RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	78
4.1.2.	SECADO DE LA PLANTA	78
4.1.3.	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD	78
4.2.	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE “AGUAYMANTO” PHYSALIS PERUVIANA Y “COLA DE CABALLO” EQUISETUM BOGOTENSE KUNTH.	80
4.2.1.	PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS	80
4.3.	DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO.....	81
4.3.1.	MARCHA FITOQUÍMICA.....	81
4.4.	ENSAYOS PRELIMINARES.....	84
4.4.1.	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	84
4.4.2.	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.....	85
4.4.3.	DETERMINACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	86
4.4.4.	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS	87
4.5.	ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS FRENTE A LA CEPA DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175.....	89
4.5.1.	ACTIVACIÓN DE LA CEPA.....	89

4.5.1.1. CURVA DE CRECIMIENTO	89
4.5.2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS FRENTE A LA CEPA DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175.....	91
4.5.2.1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	91
4.5.2.1.1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” <i>Physalis peruviana</i>	91
4.5.2.1.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA CEPA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “COLA DE CABALLO” <i>Equisetum bogotense</i> kunth.....	98
4.5.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR EL PROCEDIMIENTO DE MACRODILUCIÓN.	105
4.5.2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” <i>Physalis</i> <i>peruviana</i>	105
4.5.2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “COLA DE CABALLO” <i>Equisetum bogotense</i> kunth.	107
4.6. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” <i>PHYSALIS PERUVIANA</i> Y “COLA DE CABALLO” <i>EQUISETUM BOGOTENSE KUNTH</i>	108
4.6.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” <i>Physalis peruviana</i> Y “Cola De Caballo” <i>Equisetum bogotense</i> kunth.....	109
4.6.2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” <i>Physalis peruviana</i> Y “Cola De Caballo” <i>Equisetum bogotense</i> kunth, FRENTE A LA CEPA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	110
4.6.2.1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DEL COLUTORIO POR EL METODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.....	110

4.6.3. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” <i>Physalis peruviana</i> Y “Cola De Caballo” <i>Equisetum bogotense kunth</i>	116
4.7. IRRITACION DE LA MUCOSA ORAL.....	118
4.7.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO	118
4.7.1.1. OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS	118
4.7.1.2. OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS.....	121
4.7.1.3. INDICE DE IRRITACIÓN	123
CONCLUSIONES	124
SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES	126
BIBLIOGRAFÍA.....	127
ANEXOS.....	136

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 3.1 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DEL FRUTO DE <i>Physalis peruviana</i> "AGUAYMANTO"	39
TABLA N° 3.2 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS RAMAS DE <i>Equisetum bogotense kunth</i> "COLA DE CABALLO"	39
TABLA N° 3.3 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL FRUTO DE <i>Physalis peruviana</i> "AGUAYMANTO"	40
TABLA N° 3.4 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DE LAS RAMAS DE <i>Equisetum bogotense kunth</i> "COLA DE CABALLO"	41
TABLA N° 3.5 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS	42
TABLA N° 3.6 IRRITACIÓN DE LA MUCOSA ORAL	42
TABLA N° 3.7 RESUMEN DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIBALES IMPLICADAS	47
TABLA N° 3.8 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA FRENTE A LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO INDEPENDIENTEMENTE	60
TABLA N° 3.9 PREFORMULACIÓN DEL COLUTORIO	65
TABLA N° 3.10 PREFORMULACIÓN DEL COLUTORIO	65
TABLA N° 3.11 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA CALIDAD DE FORMAS FARMACÉUTICAS NO ESTÉRILES	69
TABLA N° 3.12 OBSERVACIÓN DE LA IRRITABILIDAD	72
TABLA N° 3.13 DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS PARA LA PRUEBA DE IRRITACIÓN	73
TABLA N° 3.14 CRITERIOS DE ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	73
TABLA N° 3.15 CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS DE ACUERDO AL ÍNDICE DE IRRITACIÓN	75
TABLA N° 4.1 PORCENTAJE DE HUMEDAD DE <i>Physalis peruviana</i> "AGUAYMANTO" y <i>Equisetum arvense</i> "COLA DE CABALLO"	79
TABLA N° 4.2 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE <i>Physalis peruviana</i> "AGUAYMANTO" Y <i>Equisetum arvense</i> "COLA DE CABALLO"	80

TABLA N° 4.3 RESUMEN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE REACCIONES QUÍMICAS CUALITATIVAS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”	81
TABLA N° 4.4 RESUMEN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE REACCIONES QUÍMICAS CUALITATIVAS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	83
TABLA N° 4.5 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE <i>Physalis Peruviana</i> “AGUAYMANTO” Y <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”.....	84
TABLA N° 4.6 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” Y <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	85
TABLA N° 4.7 RESULTADOS DE PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” y <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”.....	86
TABLA N° 4.8 RESULTADOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” Y <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	88
TABLA N° 4.9 RESULTADOS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”	91
TABLA N° 4.10 RESULTADO DESCRIPTIVO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA De <i>Streptococcus mutans</i> FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”	93
TABLA N° 4.11 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”.....	94
TABLA N° 4.12 COMPARACIONES MULTIPLES DE DUNCAN DE LOS SUBCONJUNTOS DE LA SENSIBILIDAD DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”	95
TABLA N° 4.13 RESULTADOS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE <i>Streptococcus Mutans</i> FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	98

TABLA N° 4.14 RESULTADO DESCRIPTIVO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	100
TABLA N° 4.15 ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	101
TABLA N° 4.16 COMPARACIONES MULTIPLES DE DUNCAN DE LOS SUBCONJUNTOS DE LA SENSIBILIDAD DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	102
TABLA N° 4.17 RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	105
TABLA N° 4.18 RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO” FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	107
TABLA N° 4.19 FORMULA UNITARIA DEL COLUTORIO EN BASE A LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” y <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	108
TABLA N° 4.20 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL COLUTORIO ELABORADO	109
TABLA N° 4.21 RESULTADO DEL EFECTO DE LA ACCIÓN ANTIBACTERIAL DEL COLUTORIO ELABORADO SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	¡Error! Marcador no definido.
TABLA N° 4.22 RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” y <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO” SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	111
TABLA N° 4.23 ESTUDIO DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” y <i>Equisetum arvense</i> “COLA DE CABALLO”	112
TABLA N° 4.24 COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DE LA SENSIBILIDAD DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 Del Colutorio Comercial Listerine Frente Al Colutorio	

<i>Sin Principio Activo Y Del Colutorio Elaborado Con Los Extractos Hidroalcohólicos De Physalis peruviana “AGUAYMANTO” Y Equisetum arvense “COLA DE CABALLO”</i>	<i>113</i>
<i>TABLA N° 4.25 COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DE LOS SUBCONJUNTOS DE LA SENSIBILIDAD DE Streptococcus mutans ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE Physalis peruviana “AGUAYMANTO”, Equisetum arvense “COLA DE CABALLO” Y COLUTORIO COMERCIAL.....</i>	<i>114</i>
<i>TABLA N° 4.26 RESULTADOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL COLUTORIO ELABORADO A BASE DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE “AGUAYMANTO” Physalis peruviana Y “COLA DE CABALLO” Equisetum arvense</i>	<i>116</i>
<i>TABLA N° 4.27 REGISTRO DE OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS</i>	<i>118</i>
<i>TABLA N° 4.28 ESTIMACIÓN DEL VALOR SIGNIFICATIVO DE LA OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA MEDIANTE EL TEST DE FRIEDMAN</i>	<i>119</i>
<i>TABLA N° 4. 29 REGISTRO DE OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO</i>	<i>121</i>
<i>TABLA N° 4.30 ESTIMACIÓN DEL VALOR SIGNIFICATIVO DE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO MEDIANTE EL TEST DE FRIEDMAN.....</i>	<i>122</i>
<i>TABLA N° 4.31 ÍNDICE DE IRRITACIÓN</i>	<i>123</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>FIGURA N° 1 ARBUSTO DE AGUAYMANTO (Physalis peruviana)</i>	<i>16</i>
<i>FIGURA N° 2 COLA DE CABALLO (Equisetum bogotense kunth)</i>	<i>19</i>
<i>FIGURA N° 3 COMPONENTES PREPARADO LÍQUIDO ORAL</i>	<i>29</i>

ÍNDICE DE GRAFICOS

<i>GRÁFICO N° 1 CURVA DE CRECIMIENTO DE Streptococcus mutans ATCC 25175</i>	<i>89</i>
---	-----------

GRÁFICO N° 2 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”	96
GRÁFICO N° 3 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 frente al EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO de <i>Equisetum bogotense kunth</i> “COLA DE CABALLO”.....	103
GRÁFICO N° 4 ESTUDIO DE LA VARIANZA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO	115

INDICE DE FLUJOGRAMAS

FLUJOGRAMA N° 1 PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	54
FLUJOGRAMA N° 2 OBTENCION DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	56
FLUJOGRAMA N° 3 ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO INDEPENDIENTEMENTE	61
FLUJOGRAMA N° 4 ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO INDEPENDIENTEMENTE	64
FLUJOGRAMA N° 5 FORMULACION Y ELABORACION DE COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO.....	66
FLUJOGRAMA N° 6 ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 DEL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE <i>Physalis peruviana</i> Y <i>Equisetum bogotense kunth</i>	68

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue formular un colutorio a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum arvense* “cola de caballo”, determinar su actividad in-vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y establecer su posible irritación en la mucosa oral en animales de experimentación. Se realizó el método experimental de difusión de disco (Kirby Bauer) para la determinación de la sensibilidad de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al colutorio elaborado y el método experimental de macrodilución para así determinar la CMI que posteriormente fue utilizada para la formulación del colutorio. Al final se evaluó mediante un estudio histopatológico la irritación de la cavidad oral del colutorio elaborado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* “aguaymanto” obtuvo mayor diámetro de halos de sensibilidad a partir de 75 mg/500uL con un promedio de 12.855 mm y para el extracto hidroalcohólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” se obtuvo halos de sensibilidad a partir de 75 mg/500uL con un diámetro promedio de 10.72 mm, mediante la prueba de macrodilución se obtuvo una CMI de 16 mg/mL de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y de 32 mg/mL de *Equisetum arvense* “cola de caballo” estos valores se emplearon para la elaboración del colutorio. Posteriormente se realizó la evolución de las características fisicoquímicas obteniendo un pH de 6,05 y una densidad de 1.026 g/mL; microbiológico en donde se obtuvo que el colutorio elaborado estuvo libre de cualquier tipo de contaminación finalmente, se evaluó histopatológicamente la irritación del colutorio elaborado en *Mesocricetus auratus* “hámsters sirios” machos a los cuales se les aplicó el colutorio por 7 días durante 4 horas seguidas en la cavidad de la bolsa gular izquierda y se realizó el estudio tanto macroscópica como microscópicamente. En los cuales se observó que no presentan ningún tipo de lesión en la cavidad del tejido oral y el valor de significancia fue >0.05 por lo tanto se aceptó la hipótesis nula, clasificando el colutorio elaborado como no irritante.

Se concluye que, el colutorio elaborado con los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y de *Equisetum arvense* “cola de caballo” presenta actividad bacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 que es similar al colutorio comercial listerine y no presenta irritación en la cavidad oral.

Palabras clave: *Physalis peruviana*, *Equisetum arvense*, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, colutorio, estudio histopatológico.

SUMMARY

The objective of this research was to formulate a mouthwash based on the hydroalcoholic extracts of *Physalis peruviana* "aguaymanto" and *Equisetum arvense* "horsetail", to determine its in-vitro activity on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and to establish its possible irritation in the mucosa oral in experimental animals. The experimental disk diffusion method (Kirby Bauer) was carried out to determine the sensitivity of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 against the elaborated mouthwash and the experimental macrodilution method to determine the MIC that was later used for the mouthwash formulation. At the end, the irritation of the oral cavity of the elaborated mouthwash was evaluated by means of a histopathological study.

According to the results obtained, the hydroalcoholic extract of *Physalis peruviana* "aguaymanto" obtained a greater diameter of sensitivity halos from 75 mg / 500uL with an average of 12,855 mm and for the hydroalcoholic extract of *Equisetum arvense* "horsetail" it was obtained sensitivity halos from 75 mg / 500uL with an average diameter of 10.72 mm, by means of the macrodilution test a MIC of 16 mg / mL of *Physalis peruviana* "aguaymanto" and of 32 mg / mL of *Equisetum arvense* "cola of horse" these values were used for the elaboration of the mouthwash. Subsequently, the evolution of the physicochemical characteristics was carried out, obtaining a pH of 6.05 and a density of 1,026 g / mL; where it was obtained that the elaborated mouthwash was free of any type of contamination, finally, the irritation of the elaborated mouthwash was evaluated histopathologically in *Mesocricetus auratus* "Syrian hamsters" male to which the mouthwash was applied for 7 days during 4 hours in a row in the cavity of the left gular bag and the study was performed both macroscopically and microscopically. In which it was observed that they did not present any type of lesion in the oral tissue cavity and the significance value was > 0.05 , therefore the null hypothesis was accepted, classifying the elaborated mouthwash as non-irritating.

It is concluded that the mouthwash made with the hydroalcoholic extracts of *Physalis peruviana* "aguaymanto" and *Equisetum arvense* "horsetail" shows bacterial activity against *Streptococcus mutans* ATCC 25175, which is similar to the commercial listerine mouthwash and does not present irritation in the oral cavity. .

Key words: *Physalis peruviana*, *Equisetum arvense*, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mouthwash, histopathological study.

ABREVIATURAS

ATCC:	American Type Culture Collection.
ANOVA:	Análisis de varianza
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
g:	Gramo
ug:	Microgramo
mL:	Mililitro
uL:	Microlitros
OMS:	Organización mundial de la salud
Sp:	Especie
UFC:	Unidad formadoras de colonias
NCCLS:	National Commitlee for Clinical Laboratory Standards
m.s.n.m:	Metros sobre el nivel del mar
pH:	Potencial de hidrogeniones

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales viene desde tiempos remotos de la humanidad. Estas plantas, contienen diferentes sustancias como principio activo que son utilizadas por su acción fármaco-terapéutica. (1) Por ejemplo, plantas que tienen una actividad antibacteriana eficaz que es apto para eliminar diferentes bacterias de la cavidad bucal como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, etc. (2) Hoy en día, según informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 80% de la población mundial, opta por la medicina tradicional para sus necesidades principales de atención médica. (3)

El plan nacional de salud ha reconocido los diferentes problemas de salud en el Perú, e iniciaron esfuerzos a fin de disminuirlos y eliminarlos, entre los mayores problemas de salud indica, una alta prevalencia de enfermedades bucales como caries dental que es uno de los 12 principales problemas de salud en el Perú, y epidemiológicamente en los últimos años a nivel nacional su incidencia es de un 90.4% en los peruanos. (4)

En la actualidad uno de los métodos de prevención de caries dental más utilizados por la población seguidos de la pasta dental son los colutorios, que se observa que son muy comercializados, sin embargo, hoy en día ha ido aumentando el gran interés por la utilización de extractos naturales, como una alternativa para la protección contra microorganismos causantes de diferentes enfermedades. (2) Esta situación nos brinda la oportunidad de investigar y estudiar el uso de extractos hidroalcohólicos, en este caso, de las especies vegetales de *Physalis peruviana* y *Equisetum bogotense kunth* por sus propiedades antibacterianas y antisépticas.

En el presente trabajo de investigación se elaboró un colutorio a base de los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto y cola de caballo y se determinó la actividad in vitro como la sensibilidad y concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante los métodos de difusión de disco Kirby Bauer y macrodilución respectivamente frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El estudio servirá como una alternativa base para la elaboración futura de un producto farmacéutico que será aplicable en el área odontológica.

CAPÍTULO I

ASPECTOS GENERALES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde la antigüedad, los pobladores utilizaban las plantas medicinales como fuente de tratamiento para las diferentes enfermedades que aquejaban, desde ahí los conocimientos adquiridos han ido evolucionando, ya que por medio de las investigaciones las plantas están siendo fuentes importantes de la producción de distintas formulaciones farmacéuticas. (3)

Por consiguiente, la utilización de plantas con efectos terapéuticos fue y seguirá siendo una de las principales alternativas para la prevención y curación de diferentes patologías, siendo necesario utilizar responsablemente estos productos naturales de la región para su cuidado y su prevalencia y así pueda ser utilizada en el futuro. (5)

Hoy en día la población viene siendo afectada por distintos problemas de salud periodontal, principalmente la caries dental, siendo este el principal problema de salud oral mundialmente por lo cual es imprescindible tener el control y la prevención de dichas patologías dentales con el uso de productos de limpieza bucal (6).

Según la OMS la prevalencia de caries dental mundialmente está en un rango de 60% - 90%, en el Perú la Oficina General de Epidemiología y Dirección General de Salud de las Personas en el año 2001 (último estudio epidemiológico nacional realizado por el MINSA) la prevalencia fue: 90,4% en edad escolar y los departamentos con mayor prevalencia fueron Cusco (97,2%), Huancavelica (98,3%), Ica (98,8%) y Ayacucho (99,8%). (7)

Actualmente al aguaymanto se le considera uno de los 5 mejores frutos que se producen en el Perú para la salud por sus altos contenidos vitamínicos, compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos, etc. Por los compuestos fenólicos y sesquiterpenos que posee se le atribuye actividad antimicrobiana. (5). Así se puede evidenciar en los estudios realizados por Romero (2018) y Uriol (2019),

Otra de las plantas con actividad antiséptica, antibacteriana y remineralizante es la famosa cola de caballo ya que es excelente para el tratamiento de problemas bucodentales, como la gingivitis; tiene fenoles, quinonas, taninos, flavonoides, azúcares y glicósidos en su composición, que actúa en la prevención de la destrucción de la pieza

dental que es provocada por la caries. (8). Así se puede evidenciar en el estudio realizado por Cáceres (2018).

Las investigaciones del aguaymanto (*Physalis peruviana*) y cola de caballo (*Equisetum bogotense kunth*) como antibacterianos y antisépticos contra la caries dental es escaso por lo cual la finalidad del presente trabajo fue investigar tanto teórica como experimentalmente el uso del aguaymanto y cola de caballo, en forma de colutorio frente a la cepas de *Streptococcus Mutans* para lograr la prevención de la acumulación bacteriana, que a la larga causa la caries dental, también se evaluó la posible irritabilidad en el tejido oral (bolsa gular) en *Mesocricetus auratus* “hámster sirios”, ya que se pretendió evaluar la seguridad del colutorio para evitar la posible aparición de efectos adversos como el enrojecimiento de la mucosa bucal, entre otras.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

- ¿Presentará actividad in-vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 el colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” y tendrá efecto irritante sobre la mucosa oral en animales de experimentación?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Formular un colutorio a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”, determinar la actividad in-vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y establecer su posible efecto irritante en la mucosa oral en animales de experimentación.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el porcentaje de humedad y obtener el extracto hidroalcohólico del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”.

2. Evaluar las características organolépticas, propiedades fisicoquímicas (densidad, pH, marcha fitoquímica) y pruebas de solubilidad del extracto hidroalcohólico del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y del extracto hidroalcohólico de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”.
3. Determinar la sensibilidad bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al extracto hidroalcohólico del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y del extracto hidroalcohólico de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”, por el método de difusión de disco (Kirby Bauer)
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mediante el método de macrodilución.
5. Formular y elaborar un colutorio teniendo como base los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”.
6. Determinar mediante pruebas in-vitro la sensibilidad bacteriana de la cepa ATCC *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al colutorio elaborado.
7. Evaluar las características fisicoquímicas (densidad, pH,), microbiológicas y organolépticas del colutorio elaborado.
8. Evaluar histopatológicamente la irritación en la cavidad buco-oral del colutorio elaborado en animales de experimentación.

1.4 JUSTIFICACIÓN

TEÓRICO: Las enfermedades estomatológicas vienen afectando a la población mundial desde tiempos remotos y no somos ajenos en la actualidad, ya que se observa a un gran porcentaje de la población peruana, entre niños y adultos, que presentan caries dental, ya sea por los malos hábitos alimenticios y mala higiene bucal. (6)

En las áreas de la farmacología y odontología es imprescindible la utilización de la sabiduría tradicional, realizar estudios, aprovechar y trabajar con los recursos de nuestro medio y de nuestra región como las plantas medicinales, para la obtención de formulaciones y elaboración de formas farmacéuticas como colutorios, pastas dentales entre otros, para poder prevenir, tratar y curar enfermedades, como las afecciones estomatológicas (caries dental, gingivitis, periodontitis). (9) Los colutorios son de gran ayuda en la actualidad para la prevención y el tratamiento de enfermedades estomatológicas, ya que es de fácil uso y acceso para la población. (10)

PRÁCTICA: A causa del aumento en el porcentaje de casos en caries dental se decide hacer la investigación teórica-práctica en laboratorio de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” por los atributos medicinales que presenta ya que pueden ser de gran utilidad en el fármaco estomatología al encontrar propiedades o compuestos a los que se le atribuyen efectos antibacterianos y antisépticos. (11) Esta investigación nos lleva a crear un colutorio accesible a todas las personas que gustan de la medicina tradicional y alternativa, sin presentar reacciones adversas.

Al elaborar un colutorio del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas como tratamiento alternativo puede beneficiarnos ya que se está utilizando un producto natural propio de nuestra región y así se lograría resolver el problema de salud bucal principal como la caries dental, también la presente investigación servirá como base para posteriores estudios en la industria farmacéutica y fármaco-estomatológica.

1.5 HIPOTESIS

- El colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto (*Physalis peruviana*) y cola de caballo (*Equisetum bogotense kunth*) presenta actividad in-vitro frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y no presenta efecto irritante sobre la mucosa oral en animales de experimentación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 VISION HISTORICA

La caries dental proviene del latín *caries* cuyo significado es podredumbre. Los científicos dan a conocer que casos de caries no aparecieron hasta el neolítico que coincide con el desarrollo de la agricultura. (12)

Se puede encontrar antecedentes históricos, tales como el estudio arqueológico en Shanidar, Iraq, donde se encontró casi 100 dientes y ninguno de ellos presentaba algún signo de caries, por lo que se piensa que los primeros pobladores de esta zona se desarrollaron siendo inmunes a esta patología dental. (12) Algunas teorías señalan que la principal bacteria que causa la caries, *Streptococcus mutans*, no existía hasta épocas actuales y que por esta razón los primeros pobladores no presentaban caries salvo excepciones. (12)

Posteriormente se dio los primeros usos del colutorio de los cuales se tienen conocimiento que se remonta a las civilizaciones griega y romana. Es sorprendente, ya que nuestros antepasados de hace 2000 años ya se preocupaban por la limpieza de su boca y dientes. (10) Los romanos se caracterizan por demostrar un gran conocimiento de la importancia del cuidado de la salud oral, especialmente porque usaron sustancias desinfectantes. Una de las más potentes y principales, era la orina. El avance de la ciencia médica fue avanzando hasta descubrir primero el amoníaco y posteriormente el alcohol como la mejor herramienta antibacteriana. (10) El primer colutorio que salió a la venta fue 'Odol', un producto del siglo XIX después de la primera Guerra Mundial se hizo famoso el popular "Listerine" como el representante de los colutorios. (10)

En el continente americano existe más de 50 especies del "Aguaymanto". Según investigaciones la utilización del aguaymanto proviene desde las épocas precolombinas, y es oriundo de regiones andinas como el Perú. (13) Esta planta nació en los andes peruanos y fue consumido por los incas, convirtiéndose en uno de los frutos más recomendados en la población de nuestro país. (14) La tradición cuenta que en los jardines de emperadores incas este fruto fue muy preferido y cultivado con mucho esmero en el valle sagrado de los incas. (13) posteriormente con la evolución de la economía y la sociedad, este fruto se hizo conocido, desde el siglo XVIII, convirtiéndose en un producto preferido en diferentes tiendas. (13)

La planta silvestre primitiva que reinaba en el planeta desde el tiempo de los dinosaurios fue “Cola de caballo” y su nombre es proveniente de las ramitas que se asemejan a una cola de caballo. (8) Hace más de 400 millones de años en la era paleozoica esta planta por si sola formaba bosques enteros. (15) esta planta es utilizada desde la época Romana y griega por los beneficios que posee como tratar, curar heridas y por su propiedad antiséptica. (16)

2.2 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

- ORTIZ VELASCO JOSÉ DANIEL ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE LA UVILLA (*Physalis peruviana*) SOBRE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*. QUITO ECUADOR 2018.

Objetivo: evaluar in vitro el efecto inhibitorio del extracto de la uvilla (*Physalis peruviana*) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Metodología: Estudio experimental donde se usó la técnica de difusión de discos en medio sólido. Conclusión: se demostró que el *Streptococcus mutans* ATCC 35668, presenta sensibilidad al extracto de uvilla (*Physalis Peruviana*) a concentraciones del 60 y 30%, sin embargo, el microorganismo presento mayor sensibilidad frente a la clorhexidina con una concentración de 0,12% y menor sensibilidad o nula frente al agua destilada. (17)

- SALAS ROMERO SAMANTHA SOLANGE. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Physalis peruviana* VS CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*. QUITO, ECUADOR 2017.

Objetivo: Determinar las consecuencias de la inhibición del aceite esencial de *Physalis peruviana* (uvilla), comparado con la clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 3566. Metodología: se utilizó la técnica de arrastre por vapor de agua. En donde se manejaron las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% del aceite esencial, tomando como control positivo clorhexidina al 0.12% y control negativo agua destilada. La medición de los halos de inhibición se llevó acabo a las 24 y 48 horas de exposición. Conclusiones: el aceite esencial de *Physalis peruviana* al 75% y 100% posee efecto antibacteriano, sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 3566. (18)

- NEIRA OSORIO KARLA FERNANDA “ANÁLISIS IN VITRO DE TRES DENTÍFRICOS CON AGENTES ANTIBACTERIANOS Y SU EFICACIA FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC 25175) Y *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (ATCC 4356)”. QUITO, ABRIL 2016.

Objetivo: evaluar la eficacia de tres dentífricos basados en (monofluorofosfato de sodio, arginina y Aloe vera) con aparentes propiedades antibacterianas frente al mutans y Lactobacillus. Metodología: Se utilizó la técnica de difusión de disco en donde se diluyo los agentes dentales en agua estéril. Resultados: se evidenció que el agente antimicrobiano con mayor poder de inhabilitación lo tuvo la arginina, con halos de inhibición de 13.5mm en mutans y 10.8mm para Lactobacillus, seguido del Aloe vera y el monofluorofosfato de sodio. Finalmente se concluyó que la efectividad para inhibir las bacterias cariogénicas dependerá de la dilución de los componentes en cada pasta dental. (19)

- BAEZ BENAVIDES MIGUEL ANGEL. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y METANÓLICOS DE COLA DE CABALLO (*Equisetum arvense*) sobre *Aeromonas spp* Y *Staphylococcus aureus*. COLOMBIA 2015.

Objetivo: Evaluar los extractos etanólicos y metanólicos de cola de caballo (*Equisetum arvense*) sobre dos cepas bacterianas (*Aeromonas spp* y *S. aureus*). Metodología: se manejó el método de difusión de disco. Conclusiones: *Streptococcus aureus* presenta un mayor grado de sensibilidad a diferentes concentraciones con una CMI de 0.21 g/ml, en cambio *Aeromonas spp*. mostro CMI en la mayor concentración 0,99 g/ml manifestando resistencia a las demás concentraciones, por otro lado, se observó que el extracto metanólico mostró mayor porcentaje de inhibición con una media de 58.9 % frente a 33% en el extracto etanólico concluyendo así que la cepa bacteriana con mayor sensibilidad fue *S. aureus* y el solvente con mayor eficacia es el metanol. (20)

- SANDOVAL PÉREZ PAOLA CECILIA. EFECTO INHIBIDOR DEL COLUTORIO DE CIRUELA PASA SOBRE *Streptococcus mutans* Y *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*, Y COMPARACIÓN CON DOS COLUTORIOS COMERCIALES QUITO – ECUADO. Julio – 2015.

Objetivo: elaboración de un colutorio que sirva como medio de prevención alternativo ante la caries dental. Se determinó el efecto inhibidor del colutorio de ciruela pasa sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, bacterias presentes en caries; y a la vez se realizó la comparación con dos colutorios comerciales muy usados por los ecuatorianos. Metodología: se utilizó en método de arrastre de vapor para la obtención del extracto de ciruela y posteriormente se realizó el estudio in-vitro con cepas puras mencionadas con anterioridad utilizando censo discos embebidos con los 3 colutorios. Resultados: se obtuvo así que *Streptococcus mutans* fue un 93,3% resistente y *Lactobacillus acidophilus* un 88.9% resistente al colutorio de ciruela pasa; *Streptococcus mutans* un 82,2% sensible y *Lactobacillus acidophilus* un 93.3% sensible al colutorio comercial #1 (D); *Streptococcus mutans* un 91.1% resistente y *Lactobacillus acidophilus* un 82.2% resistente al colutorio comercial #2. (21)

- FRANCO OSPINA, LUIS A., MATIZ MELO, GERMAN E., PAJARO BOLIVAR INDIRA B. Y GOMEZ ESTRADA HAROL A. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE *Physalis peruviana* L. Y *Caesalpinia pulcherrima*. CARTAGENA COLOMBIA 2015.

Objetivo: analizar las actividades antibacterianas in vitro de extractos de *Physalis peruviana* L., *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, estableciendo la (CMI) y (CMB). Metodología: se empleó métodos de microdilución en caldos establecidos por el instituto de estándares clínicos y de laboratorio de los estados Unidos De América. Resultados: se encontró actividad, con valores de CMI $\leq 0,256$ mg/mL para el extracto en cloroformo de *P. peruviana*, el extracto etanólico y en éter de *C. Pulcherrima*. En relación con los resultados, se llegó a la conclusión que ambas especies son promisorias y se recomienda continuar con su estudio. (22)

2.2.2 ANTECEDENTES NACIONALES

- FERNANDEZ PAZ RAUL RAMIRO, DIFERENCIAS DEL EFECTO INHIBIDOR DE UN COLUTORIO HECHO A BASE DE ALOE VERA, LISTERINE Y ORAL B SOBRE EL STREPTOCOCCUS MUTANS Y LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS”, MOQUEGUA – PERÚ 2018

Objetivo de esta investigación es establecer las diferencias del efecto inhibidor de un colutorio hecho a base de aloe vera, y dos colutorios comerciales en este caso el Listerine y el Oral B sobre Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus. Metodología: se elaboró un colutorio experimental a base de aloe vera, luego se realizó el cultivo de las cepas bacterianas de Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus, posteriormente se hizo el estudio in vitro. Resultados: la media de inhibición para el Streptococcus mutans fue: para el aloe vera 1.13cm, el Listerine obtuvo 2.06cm, y el Oral B 2.69cm; y para la media de inhibición del Lactobacillus acidophilus los resultados fueron: para el aloe vera 0.94cm, el Listerine 0.88cm, y el Oral B 3.88cm. (23)

- URIOL PLASENCIA, DIANA ELIZABETH ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE FRUTOS DE AGUAYMANTO (*Physalis peruviana* L.) Y DE HOJAS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus* Labill) FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS TRUJILLIO PERÚ 2018.

Objetivo: evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de las hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente *Staphylococcus aureus*. Metodología: el estudio fue comparativo y experimental; se analizó la cepa de *Staphylococcus aureus* donde se realizaron 15 repeticiones, por cada una de las concentraciones para cada extracto hidroalcohólico más un control positivo con vancomicina. Resultados: el extracto hidroalcohólico de eucalipto a una concentración del 100% presentó mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. (24)

- CACERES LUPACA KATERIN. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Equisetum arvense* (COLA DE CABALLO) SOBRE EL *Streptococcus mutans*, PUNO – 2018.

Objetivo: evaluar la actividad antibacteriana in-vitro del extracto de *Equisetum arvense* sobre el *Streptococcus mutans*. Metodología: se utilizó el método de Kyrby Bauer, para determinar el efecto antibacteriano se realizó la prueba de difusión de pocillos con disco de papel filtro propuesto por el Instituto Nacional de Salud. Resultados: el extracto de cola de caballo presenta actividad antibacteriana in-vitro en las concentraciones superiores al 50% sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, mientras mayor sea la concentración, su actividad antibacteriana será mayor. (8)

- CHACALTANA RAMOS LUZ JOSEFINA HUAYANCA GUTIERREZ. IRMA CARMÉN “EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL FRUTO DE *PHYSALIS PERUVIANA* L. (AGUAYMANTO)”. ICA PERÚ 2017.

Objetivo: evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico del fruto de *Physalis peruviana* (aguaymanto). Metodología: se empleó el método de difusión en disco (disco-placa-cultivo) y método de difusión en pozo. Resultados: el extracto etanólico de *Physalis peruviana* (aguaymanto) al 100% frente a *Staphylococcus aureus* mostró efecto inhibitorio con halos de inhibición de 19,67 mm. y 20,33 mm. El porcentaje de inhibición relativa (PIR) antibacteriana y antimicótica del extracto etanólico de *Physalis peruviana* (aguaymanto) a una concentración de 25% fue de 42.7% y 68.99%. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Physalis peruviana* (aguaymanto) que resultó activa fueron 15.6 y 31.25 mg/mL. (25)

- CALSIN HUAYTA YUDITH MARIELA. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “In vitro” DEL ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ETANÓLICO DE *Equisetum arvense* “COLA DE CABALLO” FRENTE A *Escherichia coli* y *Candida albicans* UROPATÓGENAS.PUNO 2017.

Objetivos: evaluar CMI del aceite esencial y extracto etanólico de cola de caballo en relación a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans*, además determinar la sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* ATCC y *Candida albicans* frente al aceite esencial y extracto etanólico de “cola de caballo”, correlacionando con los fármacos fluconazol y gentamicina. Metodología: se utilizó en método de dilución en placa para el CMI y método de difusión en placa Kirby-Bauer para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana. Resultados: la CMI del aceite esencial de cola de caballo, en relación a *Escherichia coli* resultó del 1.0 % y 2.5 %, en cambio las concentraciones para *Candida albicans*, tanto del aceite esencial y extracto etanólico no bastaron para obtener la CMI, en cuanto a la sensibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli*, se concluye que a sus mayores dosis, son superiores a sus controles positivos gentamicina y fluconazol. (26)

- HUERTAS CAMPOS MARIANA CECILIA. EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO Y CITOTÓXICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Physalis peruviana* (CAPULÍ) SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). LIMA-PERÚ 2015.

Objetivo: determinar in vitro el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *Physalis peruviana* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Metodología: el método de estudio fue experimental in vitro. Para realizar la actividad antibacteriana se utilizó el método de difusión en agar en pocillos y para el CMI se utilizó el método de dilución en caldo BHI. Resultados: Se concluyó que el extracto metanólico de capulí tuvo efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* y no llegó a ser citotóxico. (1)

2.2.3 ANTECEDENTES LOCALES

- AGUILAR FIRATA RUTH MARIZOL, RENDÓN ANAYA. ROSALDA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (paico) y *Tagetes Multiflora* Kunth (chicjchipa) FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus Mutans* Atcc 25175, ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA Y EVALUACIÓN DE LA PRUEBA DE IRRITACIÓN DE LA MUCOSA ORAL. CUSCO PERÚ 2018.

Objetivo: evaluar cuál fue la actividad antibacteriana in-vitro de los aceites esenciales de las plantas a estudiar, en relación a la cepa de *S. mutans*, formulación de un colutorio y la evaluación de una posible irritación de en la mucosa oral en hámster. Metodología: para la obtención de los aceites esenciales se utilizó destilación por arrastre de vapor y para hallar la CMI de los aceites esenciales se utilizó de pozos en agar excavado. Resultados: se demostró que *S. mutans* posee sensibilidad a los colutorios elaborados. Por último, al realizarse la prueba de irritación de la mucosa oral según lo indicado en la norma ISO 10993-2, se dedujo que ninguno de los colutorios fue irritante sobre la mucosa oral del hámster; por consiguiente, se llegó a la conclusión que los colutorios elaborados son clasificados como “No irritantes”. (11)

- VIDAL JARA ESTRADA, EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO, DE LA *Acicarpha tribuloides* Juss (ESTRELLA KISKA), FRENTE AL *Streptococcus mutans* CUSCO – 2017

Objetivo: Determinar el EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO, DE LA *Acicarpha tribuloides* Juss (ESTRELLA KISKA), FRENTE AL *Streptococcus mutans* ATCC® 25175. Metodología: el tipo de estudio fue de tipo experimental, in vitro y prospectivo. Resultados: El extracto hidroalcohólico seco de *Acicarpha tribuloides* Juss (ESTRELLA KISKA) al 40%,60%, 80% y 100%. Tienen acción antimicrobiana sobre la cepa estándar de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™*. (27)

- BACA ZANS LISETH KARINA, YÁBAR FLUKER ADRIANA EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Foeniculum vulgare* (HINOJO), *Cimbopogon citrus* (HIERBA LUISA), *Origanum vulgare* (OREGANO), *Citrus aurantifolia swingle* (LIMON) Y *Citrus sinesis* (NARANJA), FRENTE A CEPAS ESTANDARIZADAS DE *Streptococcus mutans*, CUSCO 2016.

Objetivo: determinar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia swingle* (Limón) y *Citrus sinesis* (Naranja), con el del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas estandarizadas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175. Metodología: Los aceites esenciales de dichas plantas se obtuvieron por el método de destilación por arrastre a vapor de agua. Para realizar el estudio microbiológico se utilizó los cinco aceites esenciales mencionados a una concentración del 100 %; fueron comparados con un patrón control que fue el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% y se colocaron en placas de Agar Müller Hinton con el método Kirby Bauer donde se incorporó 10 ul de cada aceite esencial y del patrón control sobre las cepas de *Streptococcus Mutans*. Se concluye que los aceites esenciales de *Cimbopogon Citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Foeniculum Vulgare* (Hinojo) y *Citrus Sinesis* (Naranja) presentan mayor efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175, mientras que el aceite esencial *Citrus aurantifolia swingle* (Limón) no presenta efecto antibacteriano. (28)

- VICTOR MOINA GALLEGOS ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE COLUTORIOS ELABORADOS CON ACEITES ESENCIALES DE *Luma chequen* (Feuilleé ex Molina) A. Gray "ARRAYÁN" Y *Minthostachys spicata* (Benth). Epling "YURAQ MUÑA" FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 CUSCO-PERÚ 2015.

Objetivo: evaluar la acción antibacteriana In-Vitro de colutorios de los cuya elaboración incluyo a los aceites esenciales de Arrayán y Yuraq muña en relación a la cepa de *S. mutans*. Metodología: se determinó la CMI para los aceites esenciales mediante la técnica de disco difusión. Resultados: se llegó a la conclusión que el colutorio elaborado con el aceite esencial de Yuraq muña, mostró una mayor actividad antibacteriana que 'Arrayan, por otro lado, el colutorio que fue elaborado con el aceite esenciales de ambas especies

vegetales presentó menor acción antibacterial con respecto a los dos colutorios elaborados independientemente. (9)

2.3 ESTADO DEL ARTE

Según datos estadísticos de la OMS, se apreció que aproximadamente la mayor parte de la de la población a nivel mundial recurre y es más confiada en la medicina tradicional, sin embargo, son escasos los datos resultantes de investigaciones científicas encargados de realizar la evaluación de la seguridad y la eficacia de los productos y las prácticas del uso de las diferentes plantas. (1)

En la presente investigación se hará énfasis en dos plantas que son el “AGUAYMANTO” y “COLA DE CABALLO”. Según evidencia científica y diferentes trabajos de investigación, demuestran que tanto el extracto hidroalcohólico y el aceite esencial de AGUAYMANTO gracias a los fenoles y sesquiterpenos que contiene, presenta efecto inhibitorio contra bacterias gram positivas, como *S. mutans*, que es el principal causante de afecciones estomatológicas de salud pública como la caries dental. (18) En cambio, para cola de caballo no se encontró muchas investigaciones o evidencias científicas del efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans*.

En el año 2018 en Quito Ecuador, Ortiz Velasco Jose, demostró que el *Streptococcus mutans* ATCC 35668, presenta sensibilidad al extracto de uvilla (*Physalis Peruviana*) a concentraciones del 60 y 30%, el estudio experimental se realizó con la técnica de difusión de discos en medio sólido. En cambio, en el 2015 en Lima Perú Huertas Campos Mariana Cecilia, determino el efecto antibacteriano in-vitro de *Physalis peruviana* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* concluyendo que el extracto metanólico de *Physalis peruviana* tuvo efecto antibacteriano, sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

En el año 2015 en Colombia Baez Benavides Miguel Angel, evaluó la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y metanólicos de cola de caballo (*Equisetum arvense*) sobre *Staphylococcus aureus*. Se utilizó la técnica de difusión de discos en medio solido *Staphylococcus aureus* presento un mayor grado de sensibilidad a las diferentes concentraciones con una CMI de 0.21 g/ml. En cambio Caceres Lupaca en 2018 en Puno Perú evaluó la actividad antibacteriana in vitro del extracto de *Equisetum arvense* (cola de caballo) sobre *Streptococcus mutans*. En este estudio se utilizó el método de Kyrby Bauer y la prueba de difusión de pocillos con disco de papel filtro, se llevo a la conclusión que el extracto de *Equisetum arvense* (cola de caballo) posee

acción antibacteriana in-vitro con concentraciones superiores al 50%, sobre la cepa de *Streptococcus mutans*, mientras mayor sea la concentración mayor será su actividad.

En la región de Cusco no se encontró estudios recientes referidos a las plantas en estudio, con el efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*.

2.4 BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.4.1 ESPECIE VEGETAL *Physalis peruviana* “aguaymanto”

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub-clase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Sub-familia: Solanoideae

Tribu: Solanae

Género: *Physalis*

Especie: *Physalis peruviana*

(29)

2.4.1.1 CARACTERÍSTICAS

La planta de aguaymanto mantiene una consistencia herbácea, la cual presenta un ciclo de producción anual, tiene una estatura de crecimiento entre 1,2 y 1,8 metros de altura. Las hojas y los tallos presentan un recubrimiento de una pubescencia de característica fina y blanquecina, la cual va desapareciendo con el pasar del tiempo. (30) El tallo presenta diferentes características entre las más considerables podemos mencionar que el tallo esta erecto, con pocas ramificaciones, cilíndrico y alcanzado una altura estimada de 45 – 90 cm, por otra parte, las raíces tienen una consistencia fibrosa alcanzando una profundidad de 50 – 80 cm. (29) así también las hojas presentan algunas características, entre las más destacables seria la forma acorazonadas y

presencia de bordes dentados los cuales presentan diminutas espinas entre 2 – 6 cm de largo y 1,4 cm de ancho, estas hojas son vellosas; las flores presentan una forma acampanada, de gran tamaño y abiertas con un color amarillo que presentan manchas purpúreas en el interior que son fácilmente polinizadas. Por otra parte, su fruto mide entre 1,25 – 2,5 cm de diámetro, su propagación se realiza mediante semillas cada fruto puede contener entre 100 a 200 semillas fértiles, presentando una pigmentación entre amarillo y naranja, con un sabor agri dulce, están tienen un peso aproximado de 4 – 10 gramos. (30)

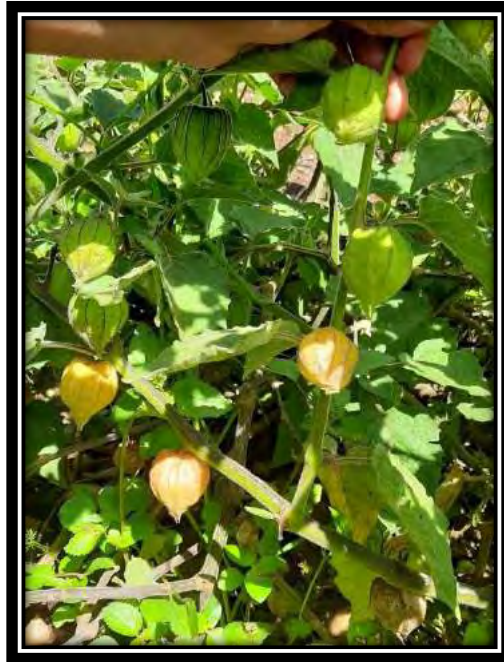


FIGURA N° 1 ARBUSTO DE AGUAYMANTO (*Physalis peruviana*)

Fuente: Maybe Quispe y Luis Mendoza

2.4.1.2 CULTIVO

La estacionalidad en la sierra del Perú es entre abril y junio y en la costa la cosecha se da entre octubre y noviembre. La cosecha se da después de 7 a 9 meses después de la primera siembra. (29)

Requerimiento de cultivo:

- Altitud: Su capacidad de crecimiento está establecido entre los 1500 y 3000 msnm de altitud.
- Temperatura: La temperatura optima promedio para su crecimiento es de 18 °C, resisten también temperaturas bajas, pero se ve afectado su crecimiento bajo los 10 °C. (29)

2.4.1.3 DISTRIBUCIÓN

El aguaymanto se extiende por Bolivia, Perú, Brasil, Colombia, Chile. Esto es debido a que puede crecer en diferentes ecosistemas ya sean climas cálidos templados, los cuales están difundidos en su mayoría en los andes, pero también se puede realizar su producción en la costa, pero en menor medida. (29)

2.4.1.4 USOS DEL AGUAYMANTO

- Efecto antibacteriano
 - *Physalis peruviana* posee efecto inhibitorio contra distintos microorganismos por los compuestos fenólicos y monoterpenos que presenta.
- Efecto hipoglucemiante
- Anticancerígeno.
- Efecto antiinflamatorio
- En odontología
 - La planta *Physalis peruviana* posee efecto antibacteriano contra los microorganismos que producen patologías buco dental. (18). Presenta el mecanismo de acción, inhibiendo las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* son los encargados y causantes del crecimiento de las caries en los dientes. (31)

2.4.1.5 PROPIEDADES

Physalis peruviana “aguaymanto” es utilizada en gran medida para diferentes tratamientos médicos, entre las enfermedades existentes están el cáncer, malaria, asma, etc. Este fruto posee propiedades analgésicas, antitóxicas, antisépticas y antibacterianas. (17)

2.4.1.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA

El género *Physalis* está compuesto por metabolitos secundarios como, flavonoides, vitaminas, alcaloides, fenil, propanoides y sesquiterpenos. (18)

El aguaymanto es un fruto con propiedades farmacológicas atribuidas por la presencia de múltiples Witanolidos (lactonas esteroideas) que son reconocidos por sus propiedades citotóxicas. También contiene proteínas, minerales y ácidos (oleico y linoleico). (32)

2.4.2 ESPECIE VEGETAL *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

División: *Equisetophyla*

Clase: *Sphenopsida*

Sub-clase: *Equisetidae*

Orden: *Equisetales*

Familia: *Equisetaceae*

Género: *Equisetum L.*

Especie: *E. bogotense kunth.* (33)

2.4.2.1 CARACTERÍSTICAS

Es una planta herbácea que llega a medir hasta 2m de altura, los tallos son cilíndricos huecos, son suaves y contienen anillos espaciados en el tronco por donde saldrán las hojas. (34)

Los tallos están formados por nudos y entrenudos que están bien diferenciados. Existen células dentro del tallo exactamente en la epidermis del mismo, las cuales son las encargadas de depositar sílice sobre la corteza del tallo, esto permite y sirve para sostener al mismo. Las hojas son muy pequeñas, de largo menos de 2cm usualmente, con aspecto escamoso, y se encuentran alrededor del tallo de una forma verticilada, al principio son fotosintéticas, pero se secan luego. (35)



FIGURA N° 2 COLA DE CABALLO (*Equisetum bogotense kunth*)

Fuente: Maybe Quispe y Luis Mendoza

2.4.2.2 HABITAT

Esta planta crecerá en lugares que son húmedos, como en lecho de ríos, fosos, o a lo largo de canales; mayormente en lugares despejados, también se ha encontrado que invade bosques artificiales de álamos. (8)

2.4.2.3 DISTRIBUCIÓN

Su distribución es mundial, en el Perú existe 3 especies pertenecientes a la familia *Equisetum* como: *E. bogotense*, *E. arvense* y *E. myriochaetum*, las cuales pueden ser encontradas a lo largo y ancho de casi toda América tropical, es así por ejemplo que, en el Perú crecen de manera considerable en la mayoría de las regiones, son las dos primeras. (26)

Su distribución se da en lugares pantanosos de la Costa y Sierra. Se encuentran en climas semicalidos, seco, semiseco y templado (34)

2.4.2.4 USOS DE COLA DE CABALLO

En la medicina tradicional botánica en Sudamérica, es uno de los remedios más populares, que se usa para inflamaciones de vejiga y riñón. En Perú se usa también para hepatitis, como diurético, como antibacterial y antiséptico. En Brasil lo utilizan contra infecciones de vesícula, indisposiciones de hígado cistitis, para desordenes de próstata y como relajante muscular. En medicina popular se usa para combatir el estreñimiento, la gripe y fiebre tifoidea. En odontología es un gran remineralizaste de los dientes, ya que evita su destrucción y cubre diferentes infecciones bucodentales. (8)

2.4.2.5 PROPIEDADES

- Antiviral (combate hepatitis A, B y C, herpes)
- Previene y elimina cálculos renales
- Antibacterial, antiséptico
- Hipotensor, analgésico e hipoglucemiante
- Diurética
- Reduce el colesterol (35)

2.4.2.6 COMPOSICIÓN QUÍMICA

En su estructura se ha encontrado alcaloides, flavonoides, lípidos esteroides, taninos, terpenos, vitamina C y saponinas. Es rico en minerales silicatados ,calcio y potasio que tienen propiedades diuréticas (35)

Existen dos principales acciones farmacológicas de importancia: la primera hace referencia a las diferentes sustancias minerales existentes en su composición destacando el SILICE, y el segundo son los glucósidos que son coadyuvantes de la sílice. (34)

2.5 CAVIDAD BUCAL

La cavidad bucal es el principio del sistema digestivo, el cual abarca la principal función de incorporar los alimentos, para su digestión, absorción y la eliminación de la materia no útil (desechos). (36). Se divide en 2 zonas: El vestíbulo oral y la cavidad bucal propiamente dicha. El vestíbulo oral se encuentra ubicado en medio de los labios entre las mejillas por una parte y los dientes por el otro lado. Por lo cual la cavidad oral verdadera se encuentra situado por atrás de las arcadas dentarias, la dentición es completa no existe comunicación directa entre el vestíbulo y la cavidad oral verdadera. (37)

2.6 BIOFILM BUCODENTAL

La cavidad bucal y oro faringe, conforma parte de un sistema de estructuras que por la temperatura forma, textura facilitan la existencia de varias especies microbianas y se conoce como flora bucal. Actualmente se sabe que la cavidad bucal está compuesta por más de 700 especies bacterianas como parte normal del microbiota bucal. (38)

Los diferentes microorganismos están distribuidos sobre las diferentes superficies de la cavidad oral, los biofilm mayormente estudiados son los que se forman sobre el diente y se divide en supra y subgingival. (39)

2.7 CARIES DENTAL

2.7.1 DEFINICIÓN

La definición de caries dental viene a ser una patología infecto contagiosa donde se produce una desmineralización de la parte superficial del diente. Este proceso es consecuencia de una serie de factores como es la deficiencia de la higiene bucal que lleva a una acumulación de la placa microbiana. (40)

Se produce por bacterias, principalmente por *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, que forman parte de la placa bacteriana estos producen ácido acético y propionico que posteriormente van a desmineralizar y desestructurar la superficie extrema del esmalte. (6)

2.7.2 SIGNOS Y SÍNTOMAS

Es manifestada por la alteración del color y la consistencia de la parte que esta siento atacada. Suele aparecer como manchas blancas o negruzcas que posteriormente dará lugar a una cavidad que avanza en profundidad. La persona presenta un dolor repentino que se manifiesta sin una causa aparente, sensibilidad en el diente y dolor al masticar. (6)

Normalmente la caries empieza de manera oculta a la vista de fisuras del diente, o en los espacios de unión dentaria. En su fase inicial puede ser detenida e incluso se puede revertir, pero en su fase ya avanzada se forma la cavidad, para lo cual será necesario un tratamiento para poder restaurar la función del diente, con la extracción del tejido careado. (41)

2.7.3 CAUSAS

Principalmente la caries es causada por la mala limpieza oral que se da el paciente, pero también existen otras causas que mencionaremos a continuación:

- Una alimentación con altos contenidos en azúcar artificiales y carbohidratos.
- Así también existen diferentes factores genéticos que pueden causar la falta de esmalte, o falta de dureza, causando que el paciente sea propenso a la aparición de caries dentro de su boca.
- La resequedad de la boca también puede ser un factor importante, pues la falta de saliva, puede deberse a algunas enfermedades o tratamientos con radio terapia, los cuales presentan una dificultad bastante preocupante. (42)

2.7.4 TIPOS

En caso de no ser curada a su debido tiempo, la infección seguirá avanzando hasta dañar la dentina, lo cual presentará un aspecto amarillento en la superficie de la dentina. (42) Según sostiene Martínez, se pueden identificar las caries de diferentes maneras, como caries de corona que se dan de acuerdo al lugar donde se presenta, similar al de fisura, radicular, interdental y recurrentes, caries que se presentan como una infección dañando la dentina.

2.8 MICRORGANISMOS RELACIONADOS A LA CARIES DENTAL

2.8.1 *STREPTOCOCCUS MUTANS*:

Fue considerado inicialmente por el autor Clarke en el año 1924 como aquel microorganismo responsable de la caries, es un coco gram positivo que se considera anaerobio facultativo, desarrollándose con una forma de cadenas. Produce ácidos producto de su metabolismo por ello de su potencial cariogénico, es acidófilo, ya que tiene una gran capacidad de sobrevivir en medio ácido. (43)

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA

Reino: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacilli

Orden: Lactobacillales

Familia: Streptococcaceae

Género: Streptococcus

Especie: *S. mutans*

Nombre binomial: *S. mutans* Clarke
1924 (9)

2.8.1.1 CARACTERÍSTICAS

El nombre de *Streptococcus mutans* se debe a que es capaz de cambiar de un coco a un bastón bajo algunas condiciones de cultivo, y que el pH sea bajo. Es una bacteria anaerobia facultativa ya que puede usar para su metabolismo el oxígeno que se encuentra en el medio ambiente, y también puede sobrevivir así haya ausencia de oxígeno total, pero su crecimiento óptimo se da en condiciones anaerobiosis. (19) Fermenta la lactosa, manitol, rafinosa, glucosa con la producción de ácido. (44) Ya que puede fermentar azúcares de la dieta a fin de generar ácido láctico, esto hace que reduzca el pH y de esta manera se reduzca la mineralización el esmalte dental. (19)

2.8.1.2 MORFOLOGÍA Y CARACTERÍSTICAS EN CULTIVO

El *Streptococcus mutans* usualmente no produce decoloración ni hemólisis en el agar sangre, principalmente es gamma o alfa hemolítico en agar sangre. Su hábitat natural está en la boca, ya que se identifica que las colonias tienen la característica de adherirse cerca de la superficie dentaria. (45)

2.8.1.3 RECURSOS METABOLICOS

El *Streptococcus mutans* obtienen la energía que necesita de los alimentos que se ingiere, y su flexibilidad genética permite a la bacteria a romper hidratos de carbono. La bacteria aprovecha sustancias como la sacarosa, la glucosa, maltosa, fructosa e incluso el almidón. (45)

2.8.1.4 MEDIO DE CULTIVO

Ya que son anaerobios facultativos, la temperatura óptima para que pueda desarrollarse es a 36+- 1°C. (46)

Se emplea medios de cultivo como:

- INFUSION DE CEREBRO CORAZON (BHI): este medio de cultivo es utilizado por el motivo de ser más eficaz para lograr cultivos de bacterias tal como *streptococos*, *meningococo*, *neumococo*, etc. (47)

2.9 CRECIMIENTO BACTERIANO

Es definido como el aumento de forma ordenada de la suma de la totalidad de los componentes de un organismo. Aumenta el tamaño cuando una célula absorbe agua, o almacena polisacáridos o lípidos esto no es un crecimiento real. La replicación de células es a partir de la fusión binaria ya que esto aumenta el número de bacterias individuales que conforma la población que se conoce como cultivo. (48)

Las bacterias pueden llegar a crecer individualmente por fisión binaria (donde la célula se alarga para consecuentemente dividirse en dos) o en caso de una población (las células llegan a duplicar su tamaño, donde se forma un septum, que consiste en el crecimiento de la pared y membrana celular para posteriormente se logre la separación de las dos células). (49) El crecimiento exponencial es la duplicación de la cantidad de células (número de células) durante in tiempo constante, en este tipo de crecimiento la cantidad de células aumentará lentamente, que pasará posteriormente a un aumento rápido, y dará resultado a una elevada cantidad de células. (49)

2.10 CURVA DE CRECIMIENTO

Al considerar la curva de crecimiento esta se realiza a través de una gráfica en la que se evidencia el crecimiento de una población bacteriana en un determinado tiempo, existen las siguientes fases: (48)

- Fase de latencia:
 - Las células se adaptan a su medio ambiente. (48)
- Fase exponencial:
 - Las células se encuentran en un estado de equilibrio. (48)
- Fase estacionaria:
 - En este periodo cesa el crecimiento. (48)

- Fase de muerte:
 - Habrá variación según el tipo de organismo y también las condiciones en las que se da el cultivo; y la tasa de muerte incrementará hasta alcanzar un nivel equilibrado. (48)

2.11 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

Para lograr determinar la concentración mínima inhibitoria se da mediante pruebas de sensibilidad o también antibiograma, que tiene como objetivo el evaluar en un espacio controlado la respuesta del microorganismo a un determinado antimicrobiano, o varios de estos. (50)

METODOLOGÍAS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La clasificación que se identifica en los métodos son cuantitativos y cualitativos.

- Los métodos cuantitativos se conceptúan como aquellos procedimientos que facultan la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), así como también la concentración mínima bactericida (CMB). (51)
 - Para determinar la CMI esta puede llevarse a cabo tanto por microdilución o macrodilución en caldo, dilución en agar o E-test. (51)
- En cuanto a los métodos cualitativos (disco difusión) se considera a aquellos métodos que facultan la clasificación de manera directa de un microorganismo como resistente o sensible. (51)
- MÉTODOS DE DIFUSIÓN

MÉTODO DEL ANTIBIOGRAMA DISCO-PLACA

El antibiograma disco-placa que se encuentra fundamentado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es considerado como uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda que para lograr la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. (50) Este es considerado como un método cualitativo, que se encuentra caracterizado por ser fácilmente estandarizable y que está indicado principalmente para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. (51)

➤ MÉTODO DE GRADIENTE ANTIBIÓTICO (E-TEST)

Este es un método cuantitativo. El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. (51)

En el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). (50) Se considera como un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana del que cabe destacar su sencillez y buena correlación con la técnica estándar de dilución en agar para el estudio de la CIM, que se detalla más adelante. (51)

➤ MÉTODOS DE DILUCIÓN

El método de dilución en agar o caldo se utiliza como prueba de susceptibilidad microbiana para determinar la concentración bactericida mínima (CMB) y la concentración inhibitoria mínima (CMI) (52)

Estos métodos están basados en el estudio del crecimiento de microorganismo en presencia de concentraciones en forma creciente del antimicrobiano, que estará diluido en el medio de cultivo. (caldo o agar). (50)

Los métodos de microdilución en caldo son considerados como una técnica útil especialmente para determinar CMI, en un gran número de muestras. (52)

2.12 COLUTORIO

El colutorio también conocido con el nombre enjuague bucal es una solución de consistencia acuosa con principios activos terapéuticos empleada generalmente para la prevención, así como tratamiento de afecciones bucales, tal como gingivitis, periodontitis, caries que se da a partir de la reducción de la placa bacteriana. (42)

La diferencia con un enjuague bucal y también de un gargarismo, se basa en su consistencia viscosa pues es más espeso al incorporar un gelidificante que tiene por objeto el aumentar la adherencia a la mucosa bucal. (53)

2.12.1 CARACTERÍSTICAS

- Especificidad
- Eficacia o potencia
- Seguridad

- Estabilidad
- Sustantividad (54)

2.12.2 TIPOS

- Clorhexidina: fármaco con función antiplaca y antibacteriana empleada principalmente cuando se detecta una enfermedad periodontal, así como también para lesiones de la mucosa, utilizado también con fines preventivos antes de una intervención quirúrgica oral.
- Hexitidina: este posee una característica antiséptica y evita el desarrollo de los hongos, acelerando en ocasiones el proceso de cicatrización después de una intervención quirúrgica periodontal.
- Povidona iodada: tiene acción que evita el desarrollo de hongos y elimina bacterias. Se emplea principalmente a fin de frenar la progresión de la gingivitis y para tratar las periodontitis que son resistentes a otros tratamientos.
- Aceites esenciales: empleados para la eliminación de placa bacteriana y la reducción de la presencia de gingivitis. Poseen una parte de alcohol y generando una sensación inicial de quemazón al aplicarse.
- Fenoles: Tienen una acción antiplaca y antiinflamatoria.
- Productos naturales: sus componentes esenciales son extractos de plantas.
- Fluoruros: compuestos formados principalmente de flúor que dota de una especificidad en la prevención de la caries.
- Sales metálicas: es necesario la aplicación en altas concentraciones de estas sales (como el fluoruro de estaño) a fin de que actúen de manera eficaz en la inhibición de la placa bacteriana.
- Agentes blanqueadores: empleados a fin de reforzar e incrementar la duración del efecto de un tratamiento blanqueamiento dental profesional. (55)

2.12.3 OBJETIVOS

- Poseen como objetivo la supresión de la placa bacteriana que se aloja en la cavidad dentaria generando las enfermedades en la cavidad bucal.
- Prever y disminuir el mal olor, así como la aparición de placa bacteriana.
- Prever y reducir la aparición de la caries y gingivitis.
- Relacionarse con la saliva y proteínas que posee la mucosa.
- Favorecer la supresión mecánica del biofilm. (53)

2.13 FORMA DE ELABORACIÓN

La Real Farmacopea Española define una preparación líquida para administración oral se define como una solución, emulsión o suspensión, que contiene uno o más ingredientes activos en un vehículo adecuado, y está destinada a ser ingerida sin dilución o previa dilución. (56)

En raras ocasiones se elaboran en forma de suspensión o como una preparación extemporánea. Llevan por lo general disolventes como la glicerina, el alcohol, el sorbitol y tensioactivo que aceleren la solubilización de los excipientes de la fórmula farmacéutica. (57)

Los edulcorantes en la formulación deben evitar la generación de caries, esto debido a que se encuentra cercano a la dentadura y agentes para mantener el pH neutral a efecto de que la acidez del colutorio perjudica al esmalte dental; la alcalinidad perjudica los tejidos gingivales. (58)

Excipientes y criterios de formulación.

En la creación de un compuesto líquido oral es necesario considerar los siguientes aspectos generales:

- La forma farmacéutica final necesariamente debe respetar el contexto fisiológico en el que se aplica.
- La formulación debe ser estable, por tal motivo se han de seleccionar excipientes de adecuada solubilidad y estables en la formulación:
 - Excipientes que resulten una compatibilidad entre ellos y a la vez con las sustancias activas.
 - Es preciso asegurar la estabilidad microbiológica (conservantes).
 - Tanto la viscosidad como el pH óptimo para obtener la máxima estabilidad de todos los componentes.
- La formulación no debe tener una interacción con el acondicionamiento primario, ni tampoco generar un desprendimiento de sustancias a la formulación. Se buscará asegurar que no se generen fenómenos de adsorción ni absorción de componentes. Además, el envase en el cual se da debe proporcionar la máxima estabilidad al preparado, por lo que resulta esencial una adecuada selección de este.
- Se adherirán los excipientes requeridos para asegurar una correcta disolución, suspensión o emulsión de los componentes.

- La formulación debe presentar suficientes propiedades organolépticas (colorantes, aromatizantes, edulcorantes). Además, al momento de escoger estos han de guardar armonía, es decir, no se puede seleccionar un sabor a chocolate con un color amarillo. (56)



FIGURA N° 3 COMPONENTES PREPARADO LÍQUIDO ORAL

2.14 CONTROL DE CALIDAD DEL COLUTORIO ELABORADO

El producto farmacéutico terminado deberá ser evaluado de acuerdo a los diferentes parámetros de control de calidad, los parámetros que varían de acuerdo al tipo de producto farmacéutico que se desea evaluar, en este caso control de calidad de solución oral, ya que al colutorio se le considera como forma farmacéutica líquida.

Los controles de calidad a considerar según la USP 40 NF-35 para formulaciones líquidas no estériles, son las siguientes.

1. Color: toda medición instrumental de color se basa en el hecho de que el ojo humano detecta el color a través de tres "receptores". Por lo tanto, todos los colores se pueden descomponer en una mezcla de tres estímulos de radiación seleccionados adecuadamente para excitar los tres receptores del ojo.
2. pH: mediante esta prueba determinaremos la actividad de iones hidrógeno, empleando el pH metro.
3. Límite microbiano: se evaluará, la calidad sanitaria del producto farmacéutico, mediante el recuento de microorganismos como: hongos levaduras mesófilos

aerobios, por lo cual es recomendable trabajar siempre en condiciones asépticas.

4. Densidad: esta basa en la relación existente, entre el peso y el volumen de una sustancia a una determinada temperatura. (59)
5. Olor: las variaciones en cuanto al aroma del producto pueden ser indicios de la degradación, del producto lo cual se determina mediante el olfato. (60)
6. Apariencia: no debe de presentar variaciones observables a simple vista. (60)

2.15 COLUTORIO CONTROL

LISTERINE ANTICARIES

- Este producto se utiliza como un enjuague bucal en un volumen de 20ml durante aproximadamente 30 segundos dos veces al día, en lo general disminuye la cantidad de placa en un promedio de 20,8% y de gingivitis en un promedio de 27,7%. Además, tiene efecto antibacteriano para bacterias que están tanto en saliva como las de la placa dental, las cuales van a ser destruidas pasando los 30 segundos de exposición a este producto. El mecanismo de acción es debido a una alteración de la pared celular bacteriana (extracción de liposacáridos y ácidos) y a la inhibición de enzimas bacterianos. (61)
- Composición: Cada 100 mL de producto contiene: Alcohol 28.4 mL; Timol 0.06 g; Eucaliptol 0.09 g; Salicilato de Metilo 0.05 g; Mentol 0.04 g; Ácido Benzoico 0.15 g.

2.16 IRRITABILIDAD

La prueba de irritación en la cavidad bucal solo se considerará para materiales con contacto previsto con el tejido oral. Se utilizarán hámsteres sirios adultos jóvenes sanos de cualquier sexo de una sola cepa de cría. Los animales deberán aclimatarse y cuidarse como se especifica según la norma ISO 10993-2. (62)

El uso de hámster como animal experimental ha permitido grandes avances en diferentes campos del conocimiento, por ejemplo, en la medicina, por sus prominentes ojos flotantes para estudios oftálmicos. Por la vascularización y accesibilidad de sus abazones, ha contribuido al campo de la estomatología. (63)

2.17 HISTOLOGÍA

Se conceptualiza como la evaluación de células y tejidos con la utilización del microscopio. Esta técnica es importante para el diagnóstico de diferentes enfermedades. (64)

ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

La técnica histológica es un conjunto de pasos que se aplica a un material biológico ya sea vegetal o animal, cuyo fin es prepararlo y concederle las características idóneas para posteriormente poder visualizar, indagar e interpretar sus características morfológicas por medio de los microscopios. (65)

- PROCEDIMIENTOS INMEDIATOS O VITALES facilitan observar y estudiar protozoarios, células sanguíneas, etc. que son suspendidas en los líquidos de su propio hábitat o solución salina. (65)
- PROCEDIMIENTOS MEDIATOS O POSTVITALES su finalidad es acondicionar células, tejidos y órganos que proceden de seres post-mortem donde es indispensable mantener las características que tenía en vida. (65)

Los pasos a seguir para alcanzar dicho objetivo son los siguientes: (65)

- Toma de la muestra
- Fijación
- Inclusión
- Microtomía
- Coloración o tinción
- Montaje

A. TOMA DE LA MUESTRA

Para iniciar con la técnica en primer lugar se debe adquirir una muestra del tejido que se estudiara, debe estar identificada desde un inicio y los recipientes deben de estar debidamente rotulados con una referencia adecuada. (66)

B. FIJACION.

La fijación es el proceso de conservación estructural y química de las células y materiales extracelulares buscando así que este lo más similar a su estado en vivo. (66)

Los objetos de la fijación son:

- Conservar las estructuras en el estado más similar al que poseían in vivo.

- Evitar la destrucción celular y la contaminación bacteriana
- Dar cierta dureza al tejido.
- El objetivo de la fijación es detener los procesos vitales. (67)

CLASIFICACION DE LOS FIJADORES: (65)

- a) Oxidantes: el tetraóxido de osmio (ácido ósmico), el bicromato de potasio, ácido crómico, bicloruro de mercurio o “sublimado corrosivo”, ácido pícrico, ácido acético.
- b) Reductores: el formaldehído, el glutaraldehído, el alcohol etílico, el alcohol metílico.

Formol o formalin: es el reactivo fijador utilizado con mayor frecuencia en los laboratorios en donde se realiza la técnica histológica. Es una solución acuosa del gas formaldehído al 39 - 40%. Su acción fijadora se ejerce coagulando las proteínas. Para la técnica histología se empleando una solución al 10%. (65)

C. INCLUSION.

Para la adquisición de cortes finos indispensablemente el tejido ha de ser endurecido hasta cierto punto ya que cuanto mayor sea su firmeza, más delgado será el corte histológico. (66)

Las sustancias de inclusión tienen como objetivo la incorporación e infiltración con el propósito de servir como soporte. (65)

Para la inclusión de las muestras en parafina se deberán seguir los siguientes. pasos: (65)

- a) Deshidratación: extracción del agua de los tejidos fijados. (66)
- b) Diafanización o aclaración: como el xilol, tolueno, benceno, y el cloroformo. (65)
- c) Inclusión y formación del bloque de parafina

D. MICROTOMIA (OBTENCIÓN DE LOS CORTES)

Las muestras histológicas deben de cortarse en láminas delgadas para facilitar la observación con el microscopio; de lo contrario al tener mayor grosor se originaría superposición celular, y problemas en la desparafinación. (66)

E. COLORACION O TINCION.

Este procedimiento consiste en que los cortes de muestras histológicas alcanza un color, mediante la actuación de un reactivo colorante. (65)

Tipos de coloración:

- Comunes: hematoxilina y eosina, azul de metileno.
 - Específicas método de Regaud. Impregnación argéntica de Cajal o Golgi.
 - Vitales: Intravitales: está basada en inyectar una sustancia inocua para el animal.
 - Supravitales: consiste en colorear tejidos vivos pero separados del organismo.
 - Metacromáticas: proporciona al tejido un color diferente al del colorante utilizado.
- (67)

COLORACION DE HEMATOXILINA - EOSINA (H&E)

Es una técnica de tinción utilizada por medio de un microscopio fotónico. Se basa en la tinción de: (65)

- a) Los núcleos por medio de una hematoxilina, anteriormente oxidada y convertida en hemateína a la cual se le agrega una sustancia mordiente para que resulte una laca.
- b) El citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado.

F. MONTAJE.

Se basa en colocar encima del corte previamente coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, diluida, mayormente en xilol y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos. Seguidamente se deja que el xilol se evapore, y la resina obtenga una suficiente solidez. (65)

Las preparaciones así tratadas conservan el color como mínimo durante cinco años.
(66)

MARCO CONCEPTUAL

- ANTIBACTERIANO: (43)
 - Se define como un fármaco con la capacidad de disminuir o inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias, sin daño alguno en el organismo infectado.

- ANTISEPTICA: (61)
 - Sustancia química que se caracteriza por la destrucción o inhibición el crecimiento de bacterias y otros microorganismos, al ser poco toxica puede colocarse sobre la piel para la prevención de futuras infecciones.

- ATCC: (68)
 - Son siglas del American Type Culture Collection una organización que se encargada de adquirir, autenticar, producir, conservar y distribuir los microorganismos de referencia estándar.

- CARIES DENTAL: (69)
 - Deterioro y destrucción de la sustancia de un diente. La caries dental está producida por el metabolismo de las bacterias en la placa adherida en la superficie del diente.

- CEPAS: (47)
 - Cepa es una población de microorganismo de una sola variante que desciende de una única célula o muestra particular la que usualmente es propagada clonalmente por el interés que se tiene por la conservación de sus cualidades.

- COLUTORIO: (70)
 - Solución acuosa con propiedades antisépticas, astringentes y desodorantes utilizada para el enjuague diario de la boca y los dientes. Los colutorios se usan para prevenir las caries y para tratar las infecciones leves de la garganta.

- **EXTRACTO: (43)**
 - Es una sustancia que, en forma concentrada, es extraída de otra, de la cual mantendrá sus propiedades.

- **EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO: (9)**
 - Macerados en alcohol etílico de diferentes graduaciones según el activo a extraer. La función del alcohol es de extraer las sustancias, o las propiedades, de las plantas. A este tipo de extracto de alcohol con agua, se le llama una tintura.

- **INHIBICIÓN: (55)**
 - Se define como el impedimento del crecimiento de microorganismos mediante la detención de las funciones normales.

- **MEDIO DE CULTIVO: (43)**
 - Es un medio energético de nutrientes y sustratos que facilitan el crecimiento, la multiplicación y el aislamiento de las diferentes especies bacterianas para llegar a su identificación y otros estudios complementarios, tales como su comportamiento frente a los antimicrobianos.

- **SALUD BUCAL: (42)**
 - Se define como la ausencia de dolor oro facial infecciones llagas bucales enfermedades periodontales que puedan limitar a la persona en poder morder, masticar, Etc.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 MATERIAL VEGETAL

- *Physalis peruviana* “aguaymanto”
- *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”

3.1.2 MATERIAL ANIMAL

- *Hamsters sirios machos*

3.1.3 MATERIAL MICROBIANO

- Cepas ATCC 25175 *Streptococcus mutans*.

3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

3.2.1 MATERIALES DE CAMPO

- Bolsas de papel de estraza (papel kraft)
- Bolsas de plásticas
- Cuchillo
- Tijeras podadoras
- Cámara fotográfica
- Block de campo
- Lápices

3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Vasos de precipitado de 50 y 100 mL.
- Tubos de ensayo de 5, 10 y 20 mL.
- Matraz de 250 mL y 500 mL.
- Baguetas
- Embudos de vidrio
- Pipetas
- Fiolas de 50mL y 100 mL.
- Probetas de 100, 250 y 500 mL.
- Tubos de ensayo de diferente tamaño
- Termómetro
- Placas Petri
- Laminas porta y cubre objeto
- Pinzas metálicas
- Soporte universal

- Botellas de vidrio acarameladas de 10, 20, 50 y 500 mL
- Micropipetas 10-100uL y 100-200 uL.
- Goteros
- Gradillas
- Asas de siembra
- Bureta de 100 mL.
- Papel filtro
- Algodón
- Mechero Bunsen
- Pinzas metálicas
- Discos de papel filtro
- Papel aluminio

3.2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Balanza analítica (0.001 gr)
- Baño maría
- Autoclave automático digital.
- Estufa eléctrica temperatura máxima 200°C
- Cocinilla eléctrica
- Incubadora
- Horno de esterilización
- Equipo destilador de agua
- Agitador magnético

3.2.4 SOLVENTES Y REACTIVOS

- Agua destilada
- Etanol de 96°
- Cloroformo Q.P.
- Benceno Q.P.
- Acetato de etileno Q.P.
- Acetona Q.P.
- Hexano Q.P.
- Éter etílico Q.P.
- Bencina Q.P.
- Tween 80

3.2.5 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Muller Hinton
- Caldo de cultivo

- Agar sangre
- Caldo BHI (caldo: infusión cerebro corazón)

3.2.6 INSUMOS

- Texapon k12
- Glirecina
- Sacarina sódica
- Sorbitol 2%

3.2.7 OTROS MATERIALES

- Guarda polvo
- Barbijos
- Gorras
- Jeringas 1, 5 y 10 mL.
- Guantes
- Vernier

3.3 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1 DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

En el trabajo de investigación, precisa evaluar la actividad in-vitro del colutorio formulado con los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* y *Equisetum bogotense kunth* sobre cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, por lo cual se realizó el siguiente diseño de investigación.

3.3.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

- Para la investigación se estableció un diseño Cuasi-experimental, porque se manipula deliberadamente al menos una variable independiente para ver su actividad antibacteriana y la relación a una o más variables dependientes.
 - En la investigación se manipularon las variables concernientes a los volúmenes de la extracción hidroalcohólica presente en el colutorio formulado y elaborado, en correlación con la actividad in-vitro que presentaron frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- Prospectivo.

- Es un estudio que se realizó con los datos obtenidos en un momento puntual en el futuro, orientando a demostrar una probable irritación de la mucosa oral al aplicar el colutorio en los animales de experimentación.

3.3.2 DISEÑO DE PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE A LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.

DISEÑO DE PRUEBA POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL.

TABLA N° 3.1 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DEL FRUTO DE *Physalis peruviana* "AGUAYMANTO"

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION 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

Fuente: elaboración propia.

Dónde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆: Cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅: Diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* "aguaymanto".
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición.

TABLA N° 3.2 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS RAMAS DE *Equisetum bogotense* kunth "COLA DE CABALLO"

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION 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

Fuente: elaboración propia.

Dónde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆: Cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅: Diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”.
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición.

3.3.3 DISEÑO DE PRUEBA DE LA ACTIVIDAD IN-VITRO SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO POR MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

TABLA N° 3.3 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL FRUTO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO”

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION 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	X ₆	O ₆
G ₇	X ₇	O ₇
G ₈	X ₈	O ₈
G ₉	-	O ₉

Fuente: elaborado por los tesistas.

Dónde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆, G₇, G₈, G₉: Cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈: Diferentes diluciones por tubos del extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* “aguaymanto”.
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆, O₇, O₈, O₉: Cuantificación de colonias.

TABLA N° 3.4 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DE LAS RAMAS DE *Equisetum bogotense kunth* "COLA DE CABALLO"

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION 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	X ₆	O ₆
G ₇	X ₇	O ₇
G ₈	X ₈	O ₈
G ₉	-	O ₉

Fuente: elaboración propia.

Dónde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆, G₇, G₈, G₉: Cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈: Diferentes diluciones por tubos del extracto hidroalcohólico de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆, O₇, O₈, O₉: Cuantificación de colonias.

3.3.4 DISEÑO DE PRUEBA DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO

ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS POR EL MÉTODO DE KIRBY BAUER

TABLA N° 3.5 DISEÑO DE POST PRUEBA Y GRUPO CONTROL DEL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION 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	-	O ₅

Fuente: elaboración propia.

Dónde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅: Cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- X₁, X₂, X₃: Colutorio elaborado con los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto”, *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”.
- X₄: Colutorio con principios activos de listerine.
- -: Ausencia de estímulo.
- O₁, O₂, O₃: Observación y medición de los halos de inhibición del colutorio elaborado.
- O₄: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo de colutorio listerine.
- O₅: Observación y medición de los halos de inhibición por el grupo control (agua destilada).

3.3.5 EVALUAR LA IRRITACIÓN DE LA MUCOSA ORAL

TABLA N° 3.6 IRRITACIÓN DE LA MUCOSA ORAL

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁ , X ₂ , X ₃ ,, X _n	O ₁ , O ₂ , O ₃ ,, O _n
G ₂	Xa ₁ , Xa ₂ , Xa ₃ ,, Xa _n	O ₁ , O ₂ , O ₃ ,, O _n
G ₃	Xb ₁ , Xb ₂ , Xb ₃ ,, Xb _n	O ₁ , O ₂ , O ₃ ,, O _n

Fuente: elaboración propia.

Dónde:

- G₁, G₂, G₃: Hámsteres sirios adultos sanos de cualquier sexo de una sola cepa.
- X₁, X₂, X₃, , X_n: Se expuso en la bolsa gular un pellet de algodón humedecido por un tiempo no menor de 5 minutos del colutorio elaborado.
- Xa₁, Xa₂, Xa₃, , Xa_n: Se expuso en la bolsa gular un pellet de algodón humedecido por un tiempo no menor de 5 minutos con agua destilada.
- Xb₁, Xb₂, Xb₃, , Xb_n: Se expuso en la bolsa gular un pellet de algodón humedecido por un tiempo no menor de 5 minutos con el colutorio listerine.
- O₁, O₂, O₃, , O_n: Observación de tejidos.

3.4 DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS

3.4.1.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

- I. Extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” en el colutorio a elaborar.

DEFINICION CONCEPTUAL:

Macerados en alcohol etílico de diferentes graduaciones según el activo a extraer. (43)

DEFINICION OPERACIONAL:

- Naturaleza : cuantitativa
- Medición : directa
- Escala : razón
- Instrumento de medición : micro pipeta
- Procedimiento de medición: Se pesó la cantidad de extracto hidroalcohólico en mg, luego se incluyó (la concentración previamente diluida) en la formulación y elaboración del colutorio.
- Indicadores : concentración de extracto hidroalcohólico.
- Expresión final : (mg/mL)

3.4.1.2 VARIABLES DEPENDIENTES

- I. Actividad in-vitro del extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* sobre la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

DEFINICION CONCEPTUAL:

Se define como actividad in-vitro al ensayo que se realiza fuera de un organismo vivo y normalmente en tejidos, células aisladas u órganos. (11)

A) FORMA DE MEDICIÓN (MACRODILUCIÓN)

DEFINICION OPERACIONAL:

- Naturaleza : cuantitativa
- Medición : directa
- Escala : razón
- Procedimiento de medición : se observó el grado de turbidez que presentaron los medios de cultivo, inoculados con *Streptococcus mutans* expuestos a los extractos hidroalcohólicos en estudio.
- Indicadores : CMI (concentración mínima inhibitoria)
- Índices:
 - ❖ Grado de turbidez
 - 0: sin turbidez (inhibición)
 - 1: leve turbidez (buena actividad)
 - 2: poca turbidez (moderada actividad)
 - 3: con turbidez (poco activo)
 - 4: con mayor turbidez (inactivo)
- Expresión final : mg/mL

B) FORMA DE MEDICIÓN (KIRBY BAUER)

DEFINICION OPERACIONAL:

- Naturaleza : cualitativa
- Medición : directa
- Escala : nominal
- Instrumento de cálculo : vernier
- Procedimiento de medición : se midió la zona alrededor del disco (halo de inhibición) producidas por las distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico usando el vernier.
- Indicadores : sensibilidad bacteriana (diámetro de halos de inhibición del crecimiento bacteriano)
- Índices : resistente/intermedio/sensible
- Expresión final : clasificación se sensibilidad
Resistente <12 mm
Intermedio de 12 a 18 mm
Sensible > a 18 mm (71)

- II. Actividad in-vitro del colutorio formulado a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

DEFINICION CONCEPTUAL:

Definido como una sustancia capaz de retrasar el crecimiento o matar bacterias existentes dentro del ambiente natural, su origen es de carácter sintético, esto quiere decir que es producido mediante la combinación de diferentes agentes químicos. (9)

DEFINICION OPERACIONAL:

- Naturaleza : cualitativa
- Medición : directa
- Escala : nominal
- Instrumento de medición : vernier
- Procedimiento de medición : se midió la zona alrededor del disco (halo de inhibición) producidos por las distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico usando el vernier.
- Indicadores : Sensibilidad bacteriana (diámetro de halos de inhibición del crecimiento bacteriano).
- Índices : sensible/resistente
- Expresión final : clasificación se sensibilidad

Resistente <12 mm

Intermedio de 12 a 18 mm

Sensible > a 18 mm (71)

III. Irritación de la mucosa oral

DEFINICION CONCEPTUAL:

Es la respuesta inflamatoria o una reacción dolorosa localizada no específica ante la aplicación única, repetida o continua de una sustancia, material o algún estímulo externo. (11)

DEFINICION OPERACIONAL:

- Naturaleza : cualitativa
- Medición : directa
- Escala : ordinal
- Instrumento de medición : microscopio
- Procedimiento de medición : se expuso por vía oral (bolsa gular) el colutorio elaborado a los animales de experimentación y se observó la posible irritación de la mucosa oral.
- Indicadores : presencia de irritación
- Expresión final : grado de irritación (Tabla 3.15)

TABLA N° 3.7 RESUMEN DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIBALES IMPLICADAS

VARIABLES		DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA/ MEDICIÓN/ ESCALA DE MEDICIÓN	PROCESO DE MEDICIÓN	INDICADOR	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
INDEPENDIENTES	Extracto hidroalcohólico de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto” y <i>Equisetum bogotense kunth</i> “cola de caballo” en el colutorio a elaborar.	Macerados en alcohol etílico de diferentes graduaciones según el activo a extraer. (43)	Cuantitativa/ Directa / Razón	Se pesó la cantidad de extracto hidroalcohólico en mg, luego se incluyó (la concentración previamente diluida) en la formulación y elaboración del colutorio.	concentración de extracto hidroalcohólico.	Micro pipeta	(mg/mL)

DEPENDIENTE	Actividad in-vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto” y <i>Equisetum bogotense kunth</i> sobre la cepa <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	Se define como actividad in-vitro al ensayo que se realiza fuera de un organismo vivo y normalmente en tejidos, células aisladas u órganos.	Forma de medición (macrodilución)	Cuantitativa / directa / razón	se observó el grado de turbidez que presentaron los medios de cultivo, inoculados con <i>Streptococcus mutans</i> expuestos a los extractos hidroalcohólicos en estudio.	CMI (concentración mínima inhibitoria)	Índices: 0: sin turbidez (inhibición) 1: leve turbidez (buena actividad) 2: poca turbidez (moderada actividad) 3: con turbidez (poco activo) 4: con mayor turbidez (inactivo)	mg/mL
			Forma de medición (Kirby Bauer)	Cualitativa / directa / nominal	se midió la zona alrededor del disco (halo de inhibición) producidas por las distintas concentraciones	sensibilidad bacteriana (diámetro de halos de inhibición del	Índices: Sensible / resistente	clasificación se sensibilidad Resistente <12 mm

				del extracto hidroalcohólico usando el vernier.	crecimiento bacteriano)	Instrumento de medición: Vernier	Intermedio de 12 a 18 mm Sensible > a 18 mm (71)
Actividad in-vitro del colutorio formulado a base de los extractos hidroalcohólicos de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto” y <i>Equisetum bogotense kunth</i> “cola de caballo” sobre <i>Streptococcus</i>	Definido como una sustancia capaz de retrasar el crecimiento o matar bacterias existentes dentro del ambiente natural, su origen es de carácter sintético, esto quiere decir que es producido mediante la combinación de diferentes agentes químicos. (9)	Cualitativa/nominal/Razón	se midió la zona alrededor del disco (halo de inhibición) producidos por las distintas concentraciones del extracto hidroalcohólico usando el vernier.	Sensibilidad bacteriana (diámetro de halos de inhibición del crecimiento bacteriano).	Índices: Sensible / resistente Instrumento de medición: Vernier	clasificación se sensibilidad Resistente <12 mm Intermedio de 12 a 18 mm Sensible > a 18 mm (71)	

	<i>mutans</i> ATCC 25175.						
	Irritación de la mucosa oral	Es la respuesta inflamatoria o una reacción dolorosa localizada no específica ante la aplicación única, repetida o continua de una sustancia, material o algún estímulo externo. (11)	Cualitativa/ Directa/ Ordinal	Se expuso por vía oral (bolsa gular) el colutorio elaborado a los animales de experimentación y se observó la posible irritación de la mucosa oral	Presencia de irritación	Microscopio	Grado de irritación

Fuente: elaboración propia.

3.4.2 VARIABLES NO IMPLICADAS

3.4.2.1 VARIABLES INTERVINIENTES

➤ DE LA PLANTA

- Zona de recolección de muestras:
 - *Physalis peruviana* “aguaymanto”: Se realizó la recolección de la especie vegetal en el distrito de la Pillpinto, Departamento del Cusco.
 - *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”: la recolección de la especie vegetal fue realiza en la provincia de Acomayo, departamento de Cusco.
- Temporada de recolección:
 - La especie vegetal *Physalis peruviana* “aguaymanto” se recolectó en los meses de febrero y marzo del 2020.
 - La especie vegetal *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” se recolectó en los meses de enero y febrero del 2020.
- Horario de recolección:
 - La especie vegetal *Physalis peruviana* “aguaymanto” se recolectó durante el día.
 - La especie vegetal *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” se recolectó durante el día.
- Estructura de la planta a estudiar:
 - Se utilizó las partes aéreas de la planta; fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto”
 - Se utilizó las partes aéreas de la planta; tallos de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”

➤ DE LAS BACTERIAS:

- Medio de cultivo: Se utilizó los medios de cultivo caldo BHI, Muller Hilton y agar sangre.

- Bacterias aisladas: Cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25715, estandarizadas y certificadas ver Anexo N° 1.

3.4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

3.4.3.1 CRITERIO DE INCLUSIÓN

➤ DE LAS PLANTAS:

- Se realizó la recolección de las partes expuestas de las plantas *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” con los tallos, lo cuales no presentaron cualquier tipo de daño evidente dentro de su composición física de la planta; con las partes aéreas de *Physalis peruviana* “aguaymanto”; con el fruto que no presenten daño evidente, haciendo la selección respectiva de los frutos según corresponda, siendo la especie vegetal identificada y certificada. Ver anexo N° 2

➤ DE LAS BACTERIAS:

- Para la selección de cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se seleccionó solo aquellas que se encontraron en un estado óptimo de almacenamiento libres de agentes degenerativos, certificados por el laboratorio GenLab SAC.

➤ DE LOS ANIMALES

- Los animales a trabajar fueron hámsteres sirios machos adultos sanos con un peso de entre 30 – 60 gr. de una sola cepa consanguínea.

3.4.3.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

➤ DE LAS PLANTAS:

- Se descartaron de la prueba que los frutos y tallos dañados, con parásitos o los que presentaron contaminantes.

➤ DE LAS BACTERIAS:

- Se descartó de manera eficiente aquellas bacterias que presentaron ciertas deficiencias al momento de la selección, además de no contar con algunas características con las que debe contar la cepa.

➤ DE LOS ANIMALES:

- No se trabajó con hámsteres, enfermos, de bajo paso o preñadas.

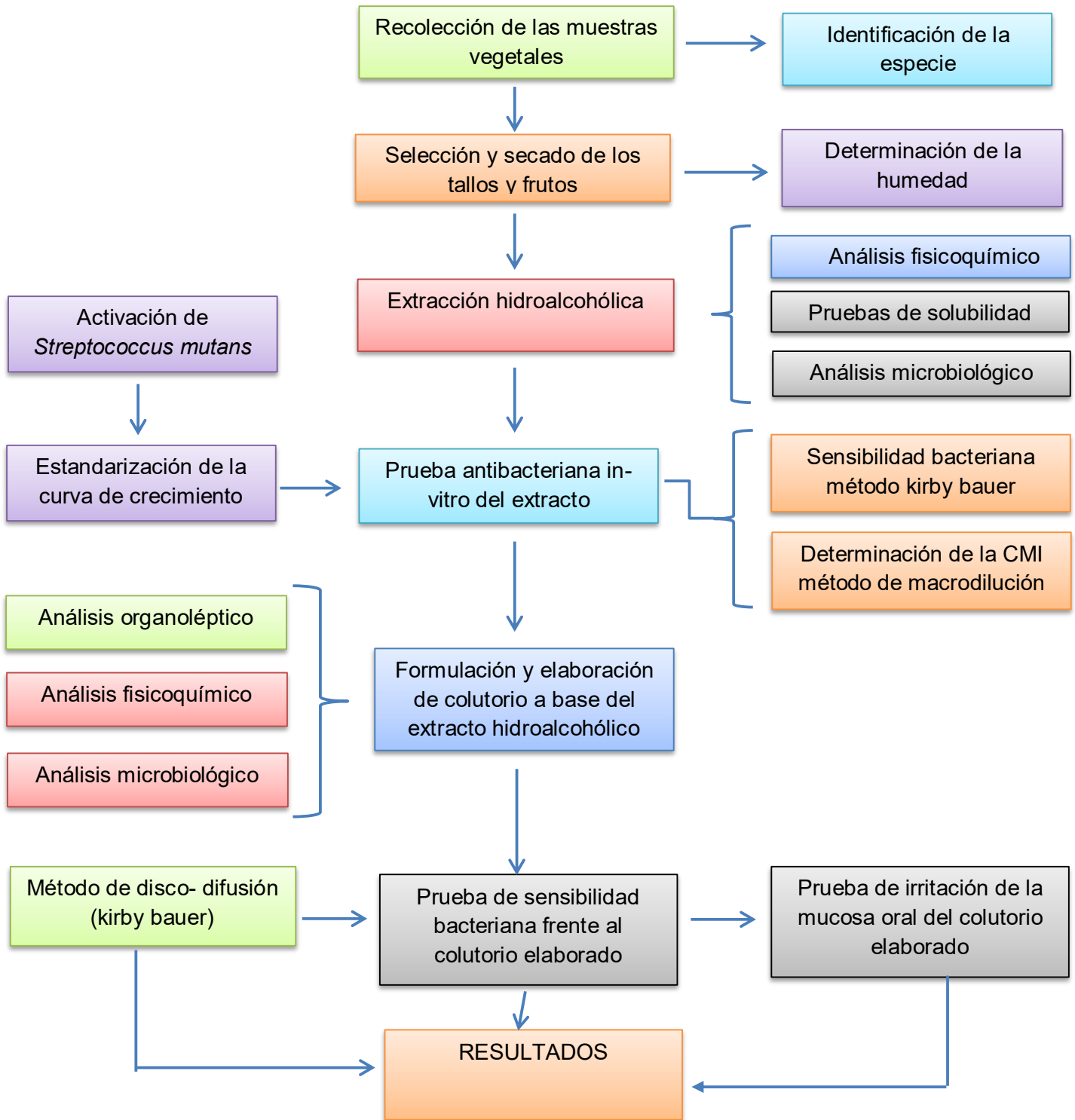
3.4.4 PROCEDIMIENTO

Se empezó con la recolección de las muestras vegetales como aguaymanto y cola de caballo en Pillpinto y C'haco respectivamente, luego se procedió a la selección y secado de los tallos y frutos de cada especie vegetal, y así mandar un ejemplar de cada especie vegetal a la oficina de clasificación taxonómica de la facultad de ciencias de la universidad nacional de san Antonio abab del cusco.

Posteriormente se determinó el porcentaje de humedad y se procedió a la extracción hidroalcoholica mediante la maceración de las especies vegetales por separado, una vez obtenida los extractos se realizó el análisis fisicoquímico pruebas de solubilidad y el análisis microbiológico. Seguidamente se realizó la activación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, para de esta manera proceder a la realización de las pruebas antibacterianas in vitro de cada uno de los extractos como son la sensibilidad bacteriana por el método de kirby Bauer y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de macrodilución.

Después se procedió a la formulación y elaboración del colutorio a base de los extractos hidroalcohólicos, del cual se realizó el análisis organoléptico fisicoquímico y organoléptico, de igual se procedió a realizar pruebas de sensibilidad bacteriana por el método de kirby, finalmente se procedió a ejecutar la prueba de irritación de la mucosa oral del colutorio elaborado en animales de experimentación.

FLUJOGRAMA N° 1 PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN



Fuente: elaboración propia.

3.4.4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

3.4.4.1.1. ADQUISICIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL

- RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO”
 - Para la recolección de aguaymanto se viajó a la provincia de la Paruro, al distrito de Pillpinto, ubicado en el departamento del Cusco.
- RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA VEGETAL DE *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”
 - Para la recolección de cola de caballo se viajó a la provincia de la Acomayo, al sector denominado Ch´aco, ubicado en el departamento del Cusco.

3.4.4.1.2. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS Y SECADO

Una vez recolectada la muestra se procedió a la selección y limpieza de los mejores ejemplares del fruto de *Physalis peruviana* “aguaymanto”; las partes aéreas de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” para luego extraer y colocarlas en el papel Kraft para su respectivo secado en un lugar fresco, ventilado en sombra y a temperatura ambiente para posteriormente obtener el extracto hidroalcohólico.

3.4.4.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Para determinar de manera eficiente el grado de humedad existente se realizó por triplicado en diferentes placas Petri limpias sin ningún agente contaminante externo, se introdujo 10 gr de muestra *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”; 10 gr de muestra de *Physalis peruviana*, las cuales posteriormente fueron llevadas a un estufa caliente a 40 C° por un lapso de 24 horas, posteriormente se procedió a verificar su peso mediante una balanza electrónica y posteriormente determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente formula. (9)

$$\%H= \frac{M1-M2}{ M1}$$

Dónde:

%H : Porcentaje de humedad

M1 : Peso de muestra fresca

M2 : Peso de muestra seca

3.4.4.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Physalis peruviana*

“AGUAYMANTO” y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

FLUJOGRAMA N° 2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO



Fuente: elaboración propia.

3.4.4.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DEL FRUTO DE AGUAYMANTO Y LAS RAMAS DE COLA DE CABALLO.

➤ CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS

- Color
 - Se procedió a observar la tonalidad del extracto hidroalcohólico.
- Sabor
 - Se tomó una muestra significativa del extracto hidroalcohólico y mediante el gusto se apreció que sabor presentaba.
- Olor
 - Se procedió a oler la muestra de extracto hidroalcohólico.
- Aspecto
 - Se analizó el aspecto externo mediante el análisis visual.

➤ DETERMINACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

- Para el ensayo de solubilidad se tomó un miligramo del extracto hidroalcohólico de los extractos del fruto de aguaymanto y de las ramas de cola de caballo, los cuales se depositaron en diferentes tubos de ensayo de igual medida, posteriormente se distribuyeron entre 1 a 3 ml de solventes de mayor a menor polaridad, como: agua destilada, etanol al 40%, 70%, 90%, acetona, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico, tween 80, bencina y metanol.

➤ DENSIDAD RELATIVA

- Procedimiento:
 - Se pesó el picnómetro teniendo el cuidado de que se encuentre totalmente seco y limpio.
 - Se llenó completamente con agua destilada y se colocó con su tapa correspondiente. Al colocar la tapa parte del líquido se

derramó y por lo cual con un trozo de papel se tuvo que secar perfectamente el recipiente y el tapón por fuera.

- Se pesó el picnómetro con el volumen incluido y se anotó el peso.
- Se vació el picnómetro y se enjuagó por duplicado con una pequeña cantidad de nuestro extracto hidroalcohólico.
- Se llenó el picnómetro con los extractos hidroalcohólicos por separado de cola de caballo y aguaymanto hasta casi rebalsar, se colocó su tapa y como en el caso anterior se secó por fuera completamente.
- Se pesó el picnómetro con el extracto hidroalcohólico y se anotó el peso. (9)

➤ DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS PRESENTES EN EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

- Marcha fitoquímica es un método de estudio que nos ayuda a determinar qué tipo de metabolito están presentes en el extracto seco de la planta, mediante reacciones químicas cualitativas, utilizándose varios reactivos, cuyas reacciones como precipitados, cambios de color, etc. nos indica la presencia de flavonoides, taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, etc.
 - Alcaloides
 - Ensayo de Dragendorff
 - Ensayo de Mayer
 - Glucósidos Cardiotónicos
 - Ensayo de Baljet
 - Esteroides
 - Ensayo de Liebermann-Burchard
 - Carotenoides
 - Ensayo de Salkowski
 - Saponinas
 - Ensayo de Espuma
 - Taninos
 - Ensayo de Cloruro férrico
 - Flavonoides

- Ensayo de Shinoda
- Quinonas
 - Ensayo Comportamiento ácido-base
- Cumarinas
 - Ensayo de Erlich

3.4.4.5. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA

3.4.4.5.1. MÉTODO DE KIRBY BAUER

- El método de Kirby Bauer, es utilizado en investigaciones que tienen que ver con el crecimiento rápido de microorganismos, en donde los datos recabados son de carácter cualitativo, este procedimiento es más utilizado para determinar la capacidad de sensibilidad de las bacterias frente a los diferentes antibióticos.
- Para determinar la densidad existente dentro del inóculo se usa una base de sulfato de bario como instrumento de medida estándar de turbidez que corresponde a un 0,5 del nefelómetro de Mc Farland. Que corresponde a 1.5×10^8 UFC/ml. (51)
- PROCEDIMIENTO:
 - Se colocó los discos de papel filtro con un dispensador o pinza estéril, ambas partes fueron presionadas una contra la otra, las cuales quedaron adheridas entre sí, estando a una distancia de 15mm de la circunferencia de la placa, tratando en lo posible que una no se superponga sobre la otra.
 - Posteriormente se colocó los discos con el principio activo en las placas, estas se incubaron a 35°C a 37°C en grupos, lo cuales no deben exceder las cinco placas durante 18 horas a 24 horas. (51)

3.4.4.5.2. PRUEBA CON EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO

➤ PROCESAMIENTO BACTERIOLÓGICO

Las muestras de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se activaron en caldo BHI, en un proceso de incubación a 37°C por 24 horas, la estandarización de la cepa fue mediante la escala de Mc Farland 0.5, por lo cual mediante una asa estéril se tomó 3 a 4 colonias de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y posteriormente se procedió a transferir a un tubo con 4 a 5 ml de solución salina estéril, se controló

la turbidez del inóculo, con el objetivo de lograr una misma turbidez que el patrón de Mc Farland 0.5, que equivale aproximadamente a 1.5×10^8 UFC/mL. Posteriormente se realizó el cultivo en agar sangre, finalmente se procedió a realizar la replicación de las cepas bacterianas por medio de nuevos sembrados en Agar Sangre, los que posteriormente se utilizaran en el desarrollo de la investigación. (11)

➤ **EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERINA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO INDEPENDIENTEMENTE**

Luego de haber realizado las pruebas piloto se procedió a evaluar la sensibilidad bacteriana de los extractos hidroalcohólicos; utilizando pinzas estériles se colocó sobre la placa Petri discos de papel filtro (0.6 mm de diámetro) con concentraciones distintas:

TABLA N° 3.8 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA FRENTE A LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO INDEPENDIENTEMENTE

CONCENTRACION DEL EXTRACTO HDROALCOHOLICO	
N°	(mg/500uL)
1	5
2	15
3	35
4	75
5	125

Fuente: Moína Gallegos, Victor 2015

Una vez realizado el procedimiento, se dejó en una incubadora 37° C por 24 horas, pasado el periodo de incubación se midió los diámetros de los halos de inhibición con vernier y se registró los resultados.

EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

FLUJOGRAMA N° 3 ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO INDEPENDIEMMENTE



Fuente: elaboración propia.

3.4.4.6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA

3.4.4.6.1. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

- La técnica de la macrodilución es usada para cada mezcla de un antibacteriano con bacteria. Se trata de exhibir o exponer a las cepas a distintas concentraciones de antibacterianos, las cuales deben someterse a diluciones por la mitad, así mismo examinar el desarrollo de los microorganismos para después examinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

- Para el primer tubo de la sucesión de diluciones se puso 2 ml de solución del Principio Activo. Se puso 1 ml. de caldo MH al resto de los tubos. A continuación, se añadió 1 ml del primer tubo para el segundo tubo utilizando una pipeta estéril. Seguidamente se mezcló el contenido del tubo 2, utilizando una pipeta distinta (para la transferencia actual y para todas las siguientes) se transfirió hacia el tercer tubo, 1 ml.
- El desarrollo de estos pasos prosigue hasta el penúltimo tubo, a éste se le retiró 1 ml, el cual se desecha. Es el último tubo el que no recibe la solución del principio activo, además este tubo sirve para controlar el crecimiento. (72)

3.4.4.6.2. PRUEBA CON EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO.

PROCESAMIENTO BACTERIOLÓGICO.

- PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO
 - El inóculo estándar, para macrodilución en caldo, se obtiene por crecimiento del microorganismo hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 en la escala de McFarland o por suspensión directa de colonias, en caldo o solución fisiológica. Una vez obtenido el inóculo de turbidez, se diluyó en caldo para ajustar el inóculo de manera tal, que luego de colocado en cada tubo contenga aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/ml. La inoculación con la suspensión estandarizada se realizó dentro de los 15 minutos de preparada la misma, para evitar que el número de microorganismos aumente por duplicación. Se realizó una dilución 1:100 del inóculo, disolviendo 0,1 mL del inóculo en 9,9 mL de medio Muller Hinton. (73)
- PREPARACION DEL INÓCULO DEL EXTRACTO
 - Se pesó 0.064 g del extracto en viales tipo Sendorff estériles, diluidos en 0.5 ml de disolución etanol/agua (1:1) para alcanzar una concentración de prueba de 64 mg/ml (Solución madre o Stock).
 - De la solución madre se obtuvo 0.2 ml y se colocó al tubo N° 01 que contenía 1.8 ml de caldo Mueller Hinton.

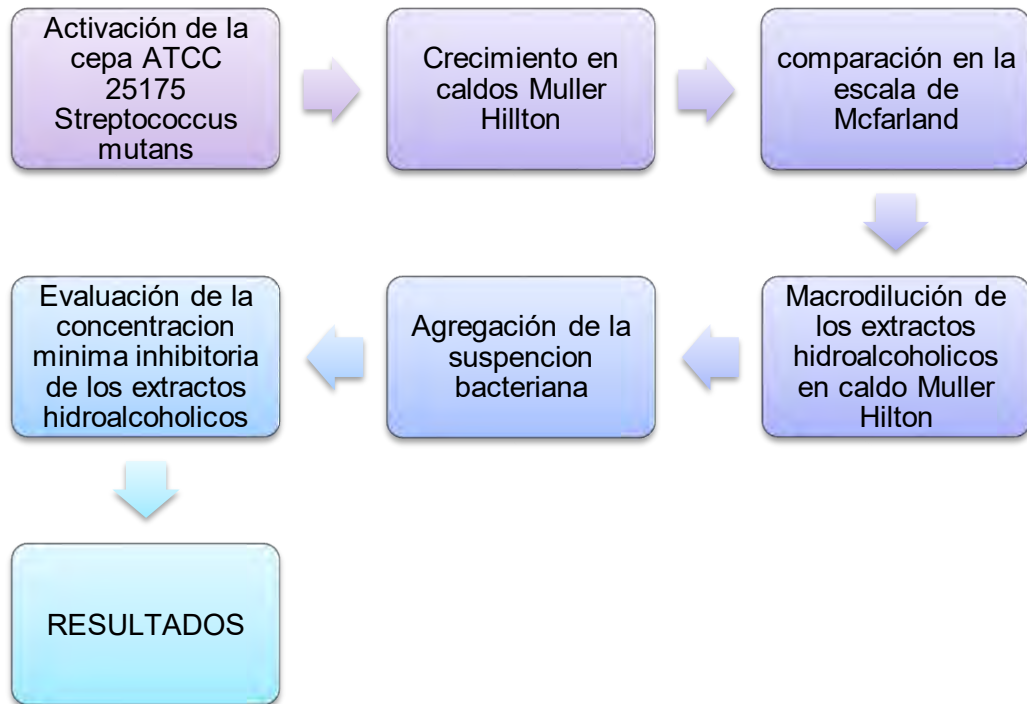
- Del tubo N° 01 se obtuvo 1 ml y se colocó al Tubo N° 02 (que contenía 1 ml de caldo Mueller Hinton); y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 08.
- Del tubo N° 08 se obtuvo 1 ml, que se desechó.
- Posterior a este proceso se colocó a todos los tubos, 1 ml de la suspensión bacteriana. El volumen final mínimo, en cada tubo, fue de 1 ml.
- Las concentraciones estuvieron entre los rangos de 32 mg/ml a 0.25 mg/ml. Los extractos no disueltos por agitación se mantuvieron por algunos minutos en baño maría a temperatura de 40°C y colocados nuevamente en el vórtex. (73)

- COLOCACIÓN DEL INÓCULO EN LOS TUBOS CON CALDOS
 - Se añadió 1 ml. del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución de muestra y al tubo control de crecimiento y se homogenizó la mezcla. No debió transcurrir más de 15 minutos entre la preparación del inóculo y su colocación en el tubo. (73)

- INCUBACIÓN
 - Se procedió a incubar los tubos de pruebas con nuestro inóculo bacteriano y del extracto, al mismo tiempo nuestro control positivo, para la mayoría de los microorganismos el tiempo de incubación fue de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución. (73)

- LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LA CMI
 - La CMI viene a ser la mínima concentración de principio activo donde no se observa desarrollo de turbidez y será expresada en mg/ml. (73)

FLUJOGRAMA N° 4 ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE AGUYMANTO Y COLA DE CABALLO INDEPENDIENTEMENTE



Fuente: elaboración propia.

3.4.4.7. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO, ELABORADO CON EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO.

Considerando la mínima densidad inhibitoria o como comúnmente se le conoce CMI (Concentración mínima inhibitoria) de los extractos hidroalcohólicos, se continuo con la formulación del colutorio.

Para el establecimiento de ésta tomamos a los excipientes que se usan más y que son más resaltantes por su importancia: elementos humectantes (sorbitol, glicerina), saborizante (menta), tensioactivo (lauril éter sulfato de sodio), endulzante (sacarina sódica), tinte natural o colorante (amarillo y verde menta) y por último al principio activo (el extracto hidroalcohólico seco de la fruta aguaymanto). Tomando en cuenta la prueba in vitro de la densidad mínima inhibitoria se determinó las concentraciones de cada principio activo (materia prima). (9)

En la tabla 9 y 10 se presentan 2 reformulaciones.

TABLA N° 3.9 PREFORMULACIÓN DEL COLUTORIO

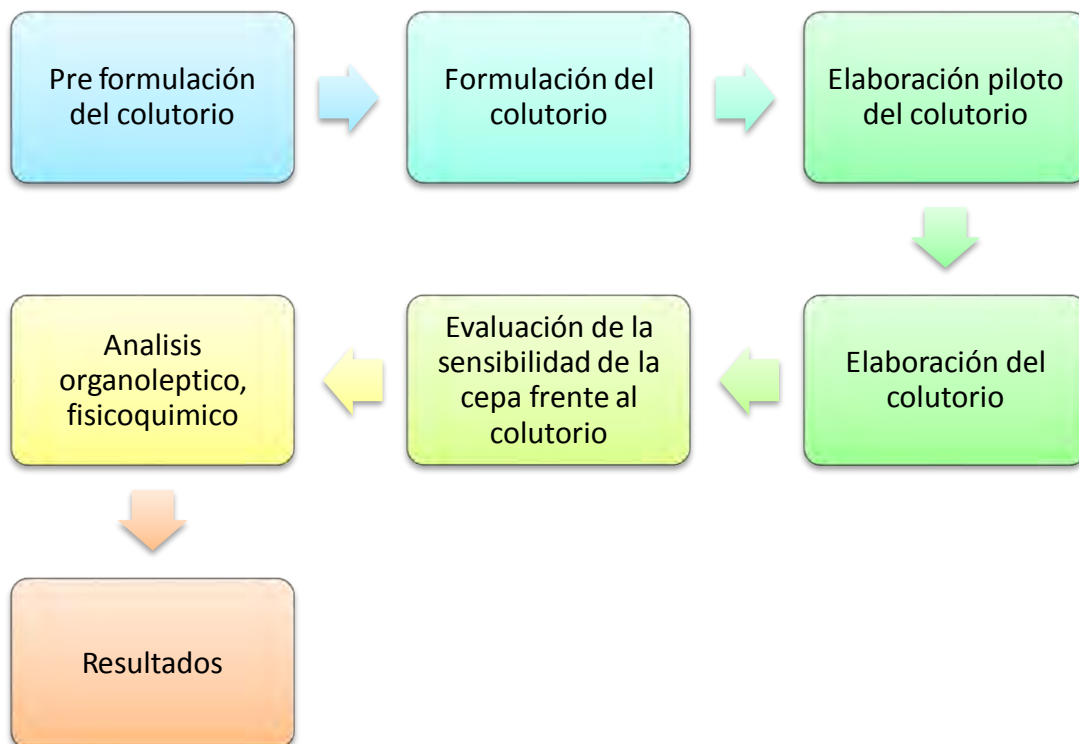
SUSTANCIA	mL
Texapon K12	1,300
Glicerina	7,360
Manitol 70%	0,600
Sacarina Sodica	0,016
Extracto hidroalcohólico seco de aguaymanto	1,000
Extracto hidroalcohólico seco de cola de caballo	1,000
Agua	C.S.P. 50,000
TOTAL	50,000

TABLA N° 3.10 PREFORMULACIÓN DEL COLUTORIO

SUSTANCIA	mL
Lauril éter sulfato de sodio	1,300
Glicerina	7,360
Sorbitol 70%	0,600
Sacarina Sodica	0,016
Sabor menta	0.900
Extracto hidroalcohólico de aguaymanto	1,000
Extracto hidroalcohólico de cola de caballo	1,000
Agua	C.S.P. 50,000
TOTAL	50,000

Primero, se pesó y se midió todos los excipientes en nuestra formulación, y luego se usó un agitador magnético para mezclar el lauril éter sulfato de sodio con glicerina, manitol y aromatizantes de menta piperita a 80 rpm por 10 minutos, poco a poco, agregue solvente (agua). En este momento, agregue sacarina sódica y tinte, y luego revuelva durante 5 minutos hasta que esté completamente disuelto. Por lo tanto, complete la receta con el disolvente restante hasta alcanzar el volumen total especificado en la receta.

FLUJOGRAMA N° 5 FORMULACION Y ELABORACION DE COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE AGUAYMANTO Y COLA DE CABALLO



Fuente: elaboración propia.

3.4.4.7.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS

MÉTODO DE KIRBY BAUER

- Este es un método cualitativo con características principales estandarizadas y adecuado para microorganismos de rápido crecimiento, basado en la investigación de Bauer y Kirby, es uno de los métodos recomendados por NCCLS para la determinación de bacterias. Sensible a los antibióticos.
- Para poderlos estandarizar cual fue la densidad del inóculo generalmente se usa una suspensión de sulfato de bario como un estándar de turbidez que pertenece a un 0,5 del nefelómetro de Mc Farland. Que corresponde a 1.5×10^8 UFC/ml.

(51)

➤ PROCEDIMIENTO:

- Se colocó los discos de papel filtro con un dispensador o pinza estéril. Al estar en la superficie del agar se debe ejercer presión los discos levemente para que puedan quedar bien pegados al mismo. Estuvieron 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 en las placas estas se incubaron de 35°C a 37°C en grupos que no fueron mayores a cinco placas durante 18 horas a 24 horas. (51)

3.4.4.7.2. PRUEBA CON EL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO

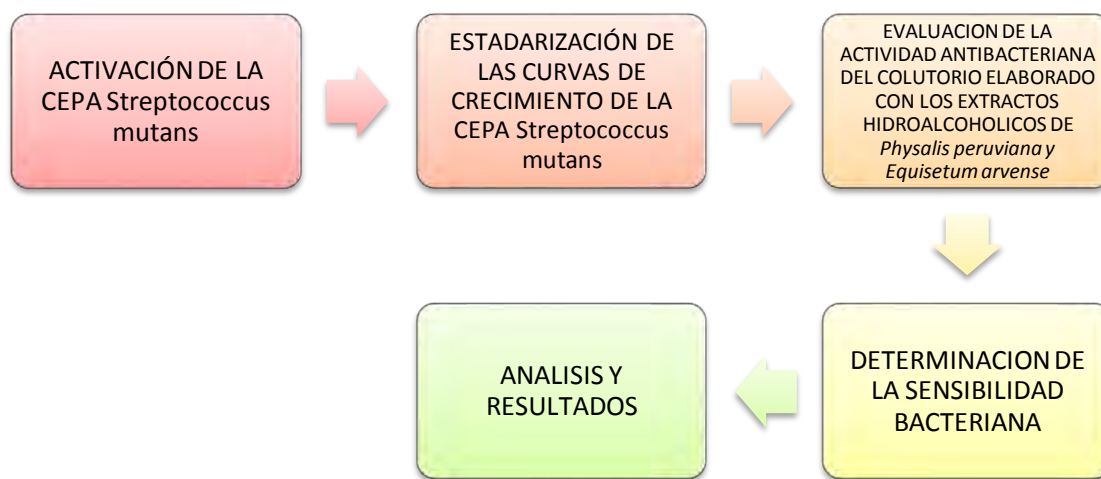
➤ PROCESAMIENTO BACTERIOLÓGICO

Las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, fueron activadas en caldo BHI, en un proceso de incubaron a 37°C por 24 horas, La estandarización de esta cepa se realiza mediante la escala Mc Farland 0.5, donde el número de anillos asépticos es 3 a cuatro colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, luego transfíralas a un tubo que contenga de 4 a 5 ml de solución salina estéril y controle la turbidez del inóculo hasta que alcance la misma turbidez que el estándar Mac Farland 0.5 equivalente a 1.5×10^8 UFC / ml .Posteriormente se realizó el cultivo en agar sangre, finalmente se procedió a realizar la replicación de la bacteria por medio de nuevos sembrados en Agar Sangre. (11)

○ DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO:

Se procedió con la evaluación in vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 del colutorio elaborado, para su desarrollo se tuvo que utilizar unas pinzas estériles las cuales fueron colocadas sobre la placa Petri los discos de papel filtro (6 mm de diámetro). Una vez realizado el procedimiento anterior se dejó en una incubadora a 37° C por 24 horas, una vez pasado el tiempo se midió los diámetros de la zona de inhibición con vernier y se apuntó los resultados. (11)

FLUJOGRAMA N° 6 ACTIVIDAD IN VITRO SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 DEL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* Y *Equisetum bogotense kunth*



Fuente: elaboración propia.

3.4.5 CONTROL DE CALIDAD DEL COLUTORIO

Los colutorios son considerados como formas farmacéuticas líquidas no estériles, por lo tanto, a estos productos se le realizan controles que garanticen su calidad, seguridad y eficacia ya que al considerarse no estériles son más propensos a ser contaminados por diversos factores como la exposición al medio ambiente el uso de conservación que se le dé durante el tiempo se usó. (11) Por lo que para proteger y garantizar su calidad se efectúan controles físicos (pH, densidad, color) y microbiológicos para mantener el colutorio a condiciones, que no afecten la integridad de quien lo utiliza. (59)

3.4.5.1 CONTROL DE CALIDAD ORGANOLÉPTICO

Se realizó ensayos para determinar el color, olor, sabor y aspecto, del colutorio elaborado a base de los extractos Hidroalcohólicos de *Physalis peruviana*. “AGUAYMANTO” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”.

3.4.5.2 CONTROL DE CALIDAD FISICO DEL COLUTORIO ELABORADO

Se determinó densidad relativa y el pH del colutorio elaborados a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana*. “AGUAYMANTO” y *Equisetum bogotense kunth*. “cola de caballo”. (59)

3.4.5.3 CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO

La presencia de microorganismos en preparaciones farmacéuticas no estériles puede reducir o incluso inactivar la actividad terapéutica de dicho producto y traer consecuencias adversas a la salud de los pacientes.

El examen microbiológico de los productos no estériles se realizará de acuerdo con los métodos previstos en la prueba de recuento microbiano y la prueba microbiana específica. Criterios de aceptación para medicamentos no estériles basados en el número total de microorganismos aeróbicos (RTMA) y hongos filamentosos y levaduras (RTCHL), microorganismos específicos (como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*) El estándar se basa en un único resultado o el promedio de recuentos repetidos. (59)

TABLA N° 3.11 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA LA CALIDAD DE FORMAS FARMACÉUTICAS NO ESTÉRILES

VIA DE ADMINISTRACIÓN	RECuento TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS (ufc/g o ufc/mL)	RECuento TOTAL COMBINADO DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS (ufc/g o ufc/mL)	MICROORGANISMOS ESPECIFICOS
Preparaciones no acuosas para uso oral	10 ³	10 ²	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> (1g o 1mL)
Preparaciones acuosas para uso oral	10 ²	10 ¹	Ausencia de <i>Escherichia coli</i> (1g o 1mL)
Uso gingival	10 ²	10 ¹	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g o 1 mL)
			Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1g o 1 mL)

Fuente: Formulario nacional USP 40-NF 35

3.4.6 PRINCIPIOS GENERALES PARA EL CUIDADO ANIMAL

- Realizar el mínimo de manipulaciones al animal y las intervenciones en su entorno, evitando perturbarlo o provocarle reacciones de alerta, refugio o escape.
- Deberá evitarse el dolor o sufrimiento que puedan experimentar los animales minimizando en mayor medida posible, con asesoramiento veterinario para el uso de sedación, anestesia apropiada, analgesia y otras medidas aplicables
- Ofrecer al animal un entorno confortable y protegido en cuanto a:
 - Agentes físicos: temperatura, humedad, ventilación, ruidos, iluminación y cama.
 - Agentes químicos: calidad de aire, ausencia de sustancias químicas o nocivas a su especie, calidad del agua y de los alimentos.
 - Agentes biológicos: ausencia de microorganismos patógenos (bacterias, virus, parásitos)
- Lograr la seguridad del confinamiento, evitando su escape o fuga, la penetración de otros animales, la exposición a daños y la ausencia de peligros.
- Las áreas de alojamiento de los animales deben ser específicas para este propósito y responder a los requerimientos establecidos para la actividad de que se trate.
- Se deben lograr los objetivos del ensayo o validación con el mínimo de variables de tiempo y de animales.
- En caso sea necesario, se deberá de aplicar la eutanasia a los animales lo más temprano posible, coherente con los objetivos científicos del estudio. (74)

ESPACIO VITAL

De preferencia, se debe mantener a los animales en espacios individualizados y cuidar que las hembras criando no sean perturbadas. (63)

Peso (g)	Área del piso por animal en cm ²	Altura en cm del piso al techo
Menos a 60	65	18
60-80	84	18
80-100	103	18

Fuente: Manejo de animales de bioterio UAM-I

CONSTANTES FISIOLÓGICAS

El hámster como roedor es de hábitos nocturnos y ante fotoperiodos cortos (menos de 8 horas de luz/ día), presenta hibernación. El cuadro 9 muestra las constantes fisiológicas del hámster de bioterio. (63)

La temperatura recomendada será de 21-23 °C, algo más en animales en apareamiento, con un 45-65% de humedad. (75)

MANEJO NUTRICIONAL

La característica del alimento debe de estar libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes, está dentro de su periodo de caducidad y almacenado en bodegas o cuartos desinfectados, secos y ventilados, sobre tarimas o contenedores. El consumo de alimento aproximado es de 5 g de alimento por 100 g de peso corporal por día. El consumo de agua es de 15 ml de agua por 100 g de peso corporal por día. (63)

Su dieta debe contener un 16% de proteínas, 5-7% de grasa, y 60-65% de carbohidratos, estimándose una ingesta aproximada de 5-7 g. de pellets diarios. También necesitan de carbohidratos complejos como almidón y celulosa para reducir la incidencia de enteritis inespecíficas, conocidas como “síndrome de la cola mojada”. A diferencia de ratones y ratas, tienen hocico chato, por lo que necesitan un comedero a ras de suelo. (75)

3.4.7 DETERMINACION DE LA IRRITABILIDAD DE LA MUCOSA ORAL

La prueba de irritabilidad se llevó a cabo según la guía metodológica (organización internacional de normalización ISO 10993-10. Se evaluó el potencial para producir irritación de la mucosa oral del colutorio elaborado.

PROCEDIMIENTO: (62)

1. Se administró la sustancia a evaluar sobre la mucosa oral directamente y sin disolución previa a temperatura ambiente.
2. Se examinó macroscópicamente la bolsa gular de cada hámster.
3. Se colocó bolitas de algodón (pellets), previamente remojadas en la muestra, en la bolsa gular izquierda de cada animal y se registró el volumen absorbido

4. Se dotó a cada animal de un collar de 3 a 4 mm de ancho, colocado alrededor del cuello permitiendo la respiración y alimentación normal, pero al mismo tiempo impidiendo al animal que pueda expulsar el pellet.
5. No se colocó ninguna muestra en la otra bolsa de la mejilla, que sirve como control, los animales de control apropiados fueron probados en paralelo.
6. La duración de la exposición fue la esperada para el uso real del material, pero no menos de 5 minutos.
7. Después de la exposición, se retiró el collar y la bolita de algodón y se lavó la bolsa con solución salina fisiológica, teniendo cuidado de no contaminar la otra bolsa.
8. Para exposición aguda, repita el procedimiento anterior cada hora ($\pm 0,1$ h) durante 4 h.

OBSERVACIÓN DE ANIMALES. (62)

1. Se examinó las bolsas macroscópicamente después de retirar los gránulos y, si se repiten las aplicaciones requeridas, inmediatamente antes de la próxima dosis.
2. Se describió la apariencia de las bolsas de las mejillas para cada animal y se calificó las reacciones de la superficie de la bolsa para eritema según el sistema dado (ver tabla 3.12) para cada animal en cada intervalo de tiempo. Se registró los resultados para el informe de prueba.
3. A las (24 ± 2) h después del tratamiento final, se examinó las bolsas de las mejillas macroscópicamente y posteriormente se sacrificó con humanidad los hámsters y se retiró muestras de tejido de áreas representativas de las bolsas gulares.

TABLA N° 3.12 OBSERVACIÓN DE LA IRRITABILIDAD

REACCIÓN	CALIFICACIÓN NUMÉRICA
Formación de eritemas y escaras	
Sin eritema	0
Muy leve eritema (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado	3
Eritema severo (enrojecimiento de la remolacha) a la formación de escaras evitando la clasificación del eritema	4
Otros cambios adversos de los tejidos deben ser registrados e informados	

TABLA N° 3.13 DISTRIBUCIÓN DE GRUPOS PARA LA PRUEBA DE IRRITACIÓN

GRUPO	N° DE ANIMALES	DOSIS DE COLUTORIO
A	3	0.5 mL
B	3	0.5 mL
C	3	0.5 mL

Fuente: elaboración propia.

A: Grupo de hámster para el colutorio elaborado a base *Physalis peruviana* y *Equisetum bogotense kunth*.

B: Grupo de hámster para el colutorio listerine.

C: Grupo de hámster control

EVALUACIÓN DE RESULTADOS

- EVALUACIÓN MACROSCÓPICA

1. Se comparó la bolsa de la mejilla tratada, con la bolsa de la mejilla en el lado contralateral y también con las bolsas de animales del grupo de control.
2. Se suman las calificaciones (ver Tabla 3.12) para cada observación y la suma se divide por el número de observaciones para determinar el grado promedio por animal.

3.4.8 ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

1. La evaluación histopatológica de la bolsa gular se realizó para examinar la irritación de la mucosa oral en hámsters. La investigación fue realizada en el laboratorio de citología e histología de Hospital Regional del Cusco.
2. Se calificó cada tejido de acuerdo con el sistema dado en la Tabla N° 3.14.

SISTEMA DE CLASIFICACIÓN PARA EXAMEN MICROSCÓPICO ORAL. (62)

TABLA N° 3.14 CRITERIOS DE ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

REACCIÓN	CALIFICACIÓN NUMÉRICA
Epitelio	
Normal, intacto	0
Degeneración celular o aplanamiento	1
Metaplasia	2
Erosión focal	3

Erosión generalizada	4
Infiltración de leucocitos (por campo de alta potencia)	
Ausente	0
Mínimo (menos de 25)	1
Leve (26-50)	2
Moderado (51-100)	3
Marcado (mayor que 100)	4
Congestión vascular	
Ausente	0
Mínimo	1
Leve	2
Moderado	3
Marcado con rotura de vasos	4
Edema	
Ausente	0
Mínimo	1
Leve	2
Moderado	3
Marcado	4

1. Se suman las calificaciones para la evaluación microscópica de todos los animales en el grupo de prueba y se divide la suma por el número de observaciones para obtener un promedio de grupo de prueba. Repita para los grupos de control. El máximo el puntaje es 16.
2. Reste el promedio del grupo de control del promedio del grupo de prueba para obtener el índice de irritación (consultar la Tabla N°3.15).

TABLA N° 3.15 CLASIFICACIÓN DE LAS SUSTANCIAS DE ACUERDO AL ÍNDICE DE IRRITACIÓN

Nota media	Descripción de la respuesta
0	Ninguno
1 a 4	Mínimo
5 a 8	Leve
9 a 11	Moderado
12 a 16	Severo
Otros cambios adversos de los tejidos deben de ser registrados e incluidos en la evaluación de la respuesta.	

3.4.8.1 PROCEDIMIENTO

Las técnicas histológicas incluyen el método de obtención de muestras de tejido utilizado en la investigación de microscopía óptica, que incluye una serie de pasos secuenciales mediante los cuales la muestra de tejido se convierte en una parte fina de color que se puede observar al microscopio. (76)

La evaluación histopatológica de la bolsa gular de los animales de experimentación se realizó para evaluar la posible irritación de la mucosa oral que puede causar el colutorio elaborado.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO HISTOPATOLOGICO (76)

1. Obtención de la muestra. Se obtuvo del animal recién muerto.
2. Fijación. Se realizó inmediatamente después de obtenida la muestra con el fin de evitar las alteraciones propias de una lisis celular. El proceso de fijación se llevó a cabo con formaldehído al 10%.
3. Deshidratación. Las muestras de tejido se sumergieron consecutivamente en soluciones de alcohol etílico en concentraciones crecientes hasta llegar a una solución al 100%.
4. Aclarado. Las muestras deshidratadas fueron sumergidas en solventes orgánicos como el xilol, cloroformo o citrisol para que se transparenten.
5. Infiltración e Inclusión. Se usó parafina como medio de inclusión, tiene por objeto proporcionar un soporte rígido al tejido que será sometido a corte, sustituyendo el espacio ocupado por los líquidos celulares por la parafina.
6. Corte. El bloque de parafina endurecida se recortó para formar un pequeño cubo el cual fue colocado en el porta muestras del micrótomó, al cual se le hicieron cortes de 4 a 7 μm de grosor.

7. Tinción. Se realizó en combinación con colorantes (hemoxilina y eosina)
8. Montaje. Una vez teñido el corte y de ser sometido a su deshidratación en alcoholes graduales y aclaración, se colocó una gota del medio de montaje (resina sintética, u otros) en el portaobjetos que tiene el tejido teñido, se colocó un cubreobjetos y se dejó secar.
9. Una vez seca la preparación, se limpió, se retiró la resina excedente y los colorantes que pudieron haber manchado el portaobjetos. Se etiquetó para dejarlas listas para la observación microscópica correspondiente.

3.4.9 TECNICA DE RECOLECCION DE DATOS

En la presente investigación se realizó la recopilación de datos utilizando la técnica de la observación, con ayuda de una cámara fotográfica, microscopio y las siguientes fichas de recolección:

3.4.9.1 INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

- Ficha de recolección de la especie vegetal. Anexo N° 6
- Ficha de recolección del porcentaje de humedad. Anexo N° 7
- Ficha de solubilidad del extracto hidroalcohólico. Anexo N° 8
- Ficha de recolección de características organolépticas y fisicoquímicas del extracto hidroalcohólico. Anexo N° 10
- Ficha de recolección de halos de inhibición de extracto hidroalcohólico. Anexo N° 12
- Ficha de recolección de características organolépticas y fisicoquímicas del colutorio elaborado. Anexo N° 15
- Ficha de recolección de características de la irritabilidad en animales de experimentación. Anexo N° 16
- Ficha de recolección para análisis histopatológico de la mucosa buco-oral en animales de experimentación. Anexo N° 17

3.4.10 TECNICAS PARA PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE LA INFORMACION

- Al realizar la parte estadística estos debieron ser ordenados y clasificados para el adecuado procesamiento de los datos.
- Se elaboró la base de datos de hojas de cálculo en el programa de Microsoft Excel y en el programa estadístico (SPSS), para el procesamiento de la información.

- Se utilizó análisis de varianza ANOVA y la prueba de significancia de DUNCAN con el 95% de confianza para un procesamiento de variables cuantitativas.
- Se utilizó el modelo estadístico ANOVA para un análisis estadístico de datos que se obtuvo de la sensibilidad de *Streptococcus mutans* frente a los extractos hidroalcohólicos elaborados.

1. PRUEBAS DE NORMALIDAD

- Mediante la normalidad se puede fijar si una agrupación de datos está bien por una distribución normal o no, o para determinar la probabilidad de una variable aleatoria en la cual se distribuye normalmente. (77)

2. ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA)

- El test de varianza (ANOVA), es la totalidad de un conjunto de situaciones experimentales y procedimientos estadísticos para el análisis de respuestas cuantitativas de unidades experimentales. Este método utilizamos para la comparación de dos o más tratamientos, dado que sólo se considera dos fuentes de variabilidad, los tratamientos y el error aleatorio. (78)

3. PRUEBA DE DUNCAN

- Al aplicar el test de análisis de varianza (ANOVA), se determina que existe una diferencia estadísticamente significativa, habitualmente habrá preguntas sobre qué par de medias son diferentes.
- Para ello se utiliza la denominada "prueba de comparación múltiple". La prueba de Duncan o la prueba de rango múltiple de Duncan nos permite comparar el promedio del "nivel T" de un factor después de usar la prueba ANOVA. Duncan considerará si dos métodos de comparación son adyacentes o opuestos, y ajustará la diferencia crítica al comparar si hay uno o más métodos entre los dos métodos. (79)

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

4.1.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las especies vegetales fueron recogidas en el mes de febrero.

- “Aguaymanto” *Physalis peruviana*, se recolecto en la comunidad de Mayuhuilca, del distrito de Pillpinto, provincia de Paruro, de la región del Cusco a una altura de 2830 msnm. Teniendo como ubicación geográfica de 13°56'30" de Latitud sur 71°46'00" de Longitud Oeste.
- “Cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se recolecto en el sector de Simpi, , provincia de Acomayo, región del Cusco a una altura de 2980 msnm. Teniendo como ubicación geográfica de 13° 55' 8" de Latitud Sur, 71° 40' 58" de Longitud Oeste.

4.1.2. SECADO DE LA PLANTA

El material vegetal recolectado fue escogido, se separó los frutos de “Aguaymanto” *Physalis peruviana*, en malas condiciones, con plagas o aquellas que fueron dañadas, luego de ello se retiró las ramas de “Cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, para su correspondiente secado, molienda y macerado.

4.1.3. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

Los resultados obtenidos del porcentaje de humedad, de los extractos hidroalcohólicos de “Aguaymanto” *Physalis peruviana* y “Cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se muestran en los siguientes cuadros:

TABLA N° 4.1 PORCENTAJE DE HUMEDAD DE *Physalis peruviana* "AGUAYMANTO" y *Equisetum bogotense kunth* "COLA DE CABALLO"

ESPECIE	PESO DE MUESTRA FRESCA	PESO DE MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO % DE HUMEDAD
<i>Physalis peruviana</i>	1000 g	143.94 g	85.06 %	86.6 %
	1050 g	144.01 g	86.28 %	
	1080 g	144.00 g	86.66 %	
<i>Equisetum bogotense kunth</i>	88.664 g	81.924 g	7.06 %	7.39 %
	88.582 g	81.891 g	7.55 %	
	88.612 g	81.900 g	7.57 %	

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.1 se muestra los promedios del porcentaje de humedad de los frutos de *Physalis peruviana*, "aguaymanto" que fue de 86.6% y *Equisetum bogotense kunth* "cola de caballo" que fue de 7.39%. El porcentaje de humedad de aguaymanto hallado concuerda con las investigaciones de Aparcana y Villareal (2014) con un porcentaje de humedad mayor o igual al 80%, y con la investigación de Rossi et.al (2012), con un porcentaje de humedad de 78.9%, el porcentaje hallado en la presente investigación está entre esos valores. La presente planta presenta un porcentaje de humedad alto, lo que le hace más propensa a ser contaminada por bacterias y hongos, por lo cual se debió tener un mayor cuidado en cuanto a su proceso de secado. (80) (81)

En cambio, cola de caballo presenta un porcentaje de humedad bajo, que concuerda con los valores hallados en la investigación de Proaño (2013) que fue de 7.38% y de Orozco, (2015), que fue de 9.92 %, el porcentaje de humedad hallado de cola de caballo se encuentra además dentro de los límites establecidos en la respectiva monografía de la USP 40, y podemos concluir que las condiciones de humedad de dicha planta son las adecuadas porque así, se evita la contaminación microbiana y la degradación de sus metabolitos. (82) (83)

4.2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana* Y “COLA DE CABALLO” *Equisetum bogotense kunth*.

La obtención de los extractos hidroalcohólicos de “aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se realizó por maceración, con alcohol al 70%.

4.2.1. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

TABLA N° 4.2 PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” Y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”.

ESPECIE	CANTIDAD DE MATERIA PRIMA	CANTIDAD DE EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	% DE RENDIMIENTO
Aguaymanto <i>Physalis peruviana</i>	4560 g.	450 mL	9.86%
Cola de caballo <i>Equisetum bogotense kunth</i>	3210 g.	1393.89 mL	44.81%

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.2 se muestra que, el extracto hidroalcohólico seco de “Aguaymanto” *Physalis peruviana* obtuvo un porcentaje de rendimiento de 9.86% y comparándolo con la investigación realizada por Aparcana y Villareal (2014), en el que obtuvieron un porcentaje de rendimiento del 10%, se puede apreciar que no existe diferencia, en dicha investigación se considera que los resultados estarían sujetos a factores como el tamaño de la muestra, tipo de almacenamiento, el tipo de fruto y el proceso de secado. (80)

En el extracto hidroalcohólico seco de “Cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 44.81% y comparándolo con la investigación realizada por Medina (2016), en la que se obtuvo 46.80%, se puede apreciar que no existe una gran diferencia y según dicha investigación el porcentaje de rendimiento es mayor en un solvente hidroalcohólico, a comparación de otros solventes como por ejemplo hexano. (84)

4.3. DETERMINACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

4.3.1. MARCHA FITOQUÍMICA

Los extractos hidroalcohólicos de “aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, fueron sometidos a reacciones químicas cualitativas, para la determinación de sus metabolitos, obteniéndose los siguientes resultados.

TABLA N° 4.3 RESUMEN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE REACCIONES QUÍMICAS CUALITATIVAS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO”

METABOLITOS SECUNDARIOS	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	
	REACTIVO	<i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”
FLAVONOIDES	Shinoda	++
	Vapores de NH ₃	++
FENOLICOS	FeCl ₃	++
QUINONAS	Börntrager	+
TANINOS	FeCl ₃ 1%	+
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	+++
GLICOSIDOS	Fehling	+++
ALCALOIDES	Dragendorff	+
SAPONINAS	Prueba de espuma	-
LACTONAS SESQUITERPENICAS	Balget	+++
ESTEROIDES	Lieberman-Burchard (L-B)	+

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio de química UNSAAC

LEYENDA:

Muy abundante : +++

Abundante : ++
Poco abundante : +
Negativo : -

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.3 se muestra todos los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico seco de *Physalis peruviana* “aguaymanto” de los cuales se observa que en mayor proporción tiene lactonas, fenoles, flavonoides, azúcares, glicósidos, lactonas sesquiterpénicas. Según Salas (2017), Romero (2018) y Uriol (2019), el género *Physalis* está formado por flavonoides y, sesquiterpenos que le atribuyen el efecto antibacteriano que es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias como *Streptococcus mutans*. (18) (31) (24)

TABLA N° 4.4 RESUMEN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS MEDIANTE REACCIONES QUÍMICAS CUALITATIVAS DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

EXTRACTO HIDROALCOHOLICO		
METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	<i>Equisetum bogotense kunth</i> “COLA DE CABALLO”
FLAVONOIDES	Shinoda	+++
	Vapores de NH ₃	++
FENOLICOS	FeCl ₃	+++
QUINONAS	Börntrager	+++
TANINOS	FeCl ₃ 1%	+++
AZUCARES REDUCTORES	Fehling	++
GLICOSIDOS	Fehling	++
ALCALOIDES	Dragendorff	-
SAPONINAS	Prueba de espuma	-
LACTONAS SESQUITERPENICAS	Balget	+
ESTEROIDES	Lieberman-Burchard (L-B)	-

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio de química UNSAAC

LEYENDA:

Muy abundante : +++
 Abundante : ++
 Poco abundante : +
 Negativo : -

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla N° 4.4 se muestra todos los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico seco de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” de los cuales se

observa que en mayor proporción tiene fenoles, quinonas, taninos, flavonoides, azúcares y glicósidos. En comparación con el trabajo de investigación de Cáceres (2018), se evidencia que la proporción alta de estos metabolitos es semejante, y se atribuyen la actividad antibacteriana a la planta. (8)

4.4. ENSAYOS PRELIMINARES

4.4.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Los resultados obtenidos de las características organolépticas de los extractos hidroalcohólicos de “aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se muestran en las tablas siguientes.

TABLA N° 4.5 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis Peruviana* “AGUAYMANTO” Y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

ORGANOLEPTICAS	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	
	<i>Physalis peruviana</i> “Aguaymanto”	<i>Equisetum bogotense kunth</i> “Cola de caballo”
ASPECTO	Translúcido	Translúcido
COLOR	Caramelo / anaranjado	Verde petróleo
OLOR	Característico	Característico
SABOR	Acido / característico	Amargo

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla N° 4.5, se observa que ambos extractos hidroalcohólicos, presenta un aspecto translúcido en el caso de *Physalis peruviana* “aguaymanto” es de un color caramelo anaranjado, y un olor característico propio del fruto, con un sabor ácido, según Lock y Rojas (2005), el color característico se debe a los carotenos presentes en el fruto; el olor y sabor tienen una característica por dos glicoconjugados que se tienen en cuenta que son precursores inmediatos del p-ment-4(8)-eno-1,2-diol y del 1-fenil-1 ,2-propanodiol, que son constituye importantes de los frutos. (85) Mientras que el extracto de *Equisetum bogotense*

kunth “cola de caballo” presenta un color verde petróleo, un olor característico de la planta, con un sabor amargo, según Bustamante (2015) el sabor amargo característico de cola de caballo se debe a los flavonoides que presentan en su composición. (86)

4.4.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las propiedades fisicoquímicas presentes en los extractos hidroalcohólicos de “Aguaymanto” *Physalis peruviana*” y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se muestran en los siguientes cuadros.

TABLA N° 4.6 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” Y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

FISICOQUÍMICAS	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	
	“ <i>Physalis peruviana</i> ” AGUAYMANTO	“ <i>Equisetum bogotense kunth</i> ” COLA DE CABALLO
DENSIDAD	1.017 g/mL	0.9281 g/mL
pH	3.0	6.0

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.6 se puede observar las propiedades fisicoquímicas de los extractos hidroalcohólicos de las plantas en estudio, para *Physalis peruviana* “aguaymanto” la densidad fue de 1.017 g/mL y con un pH de 3.0, comparado con el trabajo de investigación realizada por Tacanga (2015), en el cual el resultado de la densidad fue de 1.1031 g/mL y el pH de 3.72 estos valores demuestran que no hay mucha diferencia con nuestros resultados obtenidos, según Tacanga la maduración provoca una disminución del pH lo cual aumenta la acidez del fruto. (30)

El extracto hidroalcohólico de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” tuvo una densidad de 0.9281 g/mL y un pH 6.0, comparando con el trabajo de investigación de Proaño (2013), en el cual el resultado obtenido de la densidad fue 0.987 g/mL y un pH 5.97, estos valores demuestran que no hay mucha diferencia con nuestros resultados, según Proaño la densidad se debe a los taninos compuestos presentes en la planta. (82)

4.4.3. DETERMINACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

En la determinación de las pruebas de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos de “Aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se obtuvieron los siguientes resultados.

TABLA N° 4. 7 RESULTADOS DE PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO

SOLVENTE	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	
	<i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”	<i>Equisetum bogotense kunth</i> “COLA DE CABALLO”
AGUA DESTILADA	++	+++
ETANOL 40°	++	++
ETANOL 70°	+++	+++
ETANOL 96°	++	++
ACETONA	+	++
ACETATO DE ETILO	+	++
CLOROFORMO	-	+
ETER ETILICO	+	++
TWEEN 80	-	-
BENCINA	-	-
BENCENO	-	-
HEXANO	-	-

Fuente: elaboración propia.

Leyenda:

Muy soluble : +++
Soluble : ++

Poco soluble : +
Insoluble : -

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla 4.7 se muestran los resultados de las pruebas de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” frente a diferentes solventes polares y apolares. Según Romero (2018) para lograr un buen proceso de extracción mediante el cual se permite obtener extractos de calidad y se garantiza que se logre aislar los principios activos de las muestras vegetales la elección de un solvente apropiado es de suma importancia para así poder solubilizar los principios activos. Se observa que los extractos hidroalcohólicos son más solubles en solventes polares, como en agua destilada y etanol. Según los resultados obtenidos los extractos son de naturaleza polar, siendo el agua destilada el vehículo adecuado para el desarrollo del presente trabajo de investigación. (31)

4.4.4. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

Los extractos hidroalcohólicos de “aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, estuvieron puestos a prueba en exámenes microbiológicas indispensables para obedecer las condiciones que exige la calidad microbiológica.

Estas pruebas microbiológicas después de su realización fueron certificadas por la institución pertinente. Ver anexo N° 3

**TABLA N° 4. 8 RESULTADOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO DE
EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” Y
Equisetum bogotense kunth “COLA DE CABALLO”**

Ensayos	Extractos hidroalcohólicos		Límites permisibles
	<i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO”	<i>Equisetum bogotense kunth</i> “COLA DE CABALLO”	
Numeración de aerobios mesófilos Recuento estándar en placas estimado	Ausente	Ausente	100 UFC/g
Numeración de colifórmes	Ausente	Ausente	100-400 UFC/g
Numeración de <i>Escherichia coli</i>	Ausente	Ausente	100-400 UFC/g
Numeración de Mohos Recuento estándar en placa estimado	Ausente	Ausente	< 10 NMP/g
Numeración de levaduras Recuento estándar en placa estimado	Ausente	Ausente	< 10 NMP/g
Detención de salmonella en 25 ml	Ausente	Ausente	< 10 NMP/g

Fuente: Datos obtenidos de la constancia de análisis microbiológico.

Leyenda:

UFC: Unidades formadoras de colonias.

NMP: Método del número más probable.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la Tabla N° 4.8 se muestran los resultados del control microbiológico de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”, los cuales indican que las muestras se encuentran libres de *Aerobios mesófilos*, *Coliformes*, *Escherichia coli*, *Mohos*, *Levaduras* y *Salmonella*, por lo que podemos afirmar que nuestros extractos hidroalcohólicos estuvieron aptos para la ejecución del estudio, por ende para la elaboración del colutorio, porque de esta manera se pudo descartar los riesgos tanto de contaminación u otro tipo de alteración de nuestros resultados, cumpliéndose así

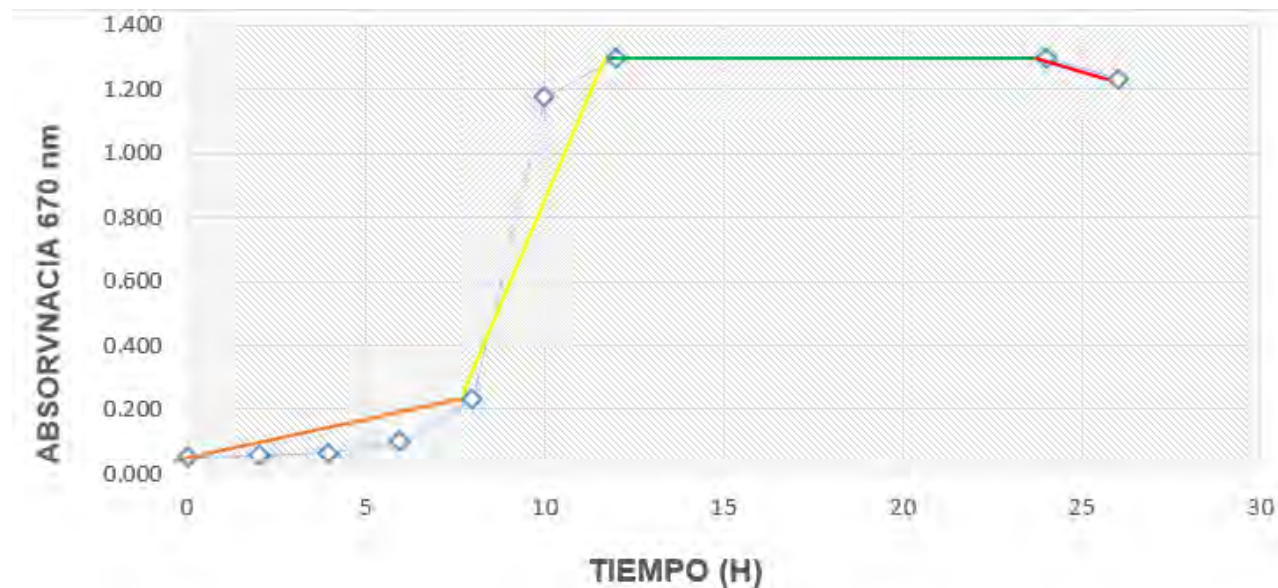
la Norma Sanitaria que instituye los criterios microbiológicos de la calidad sanitaria y la inocuidad para todos los alimentos y las bebidas que sean de consumo humano y que esté aprobado por la DIGESA (2008). (87)

4.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

4.5.1. ACTIVACIÓN DE LA CEPA

4.5.1.1. CURVA DE CRECIMIENTO

GRÁFICO N° 1 CURVA DE CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Fuente: Datos obtenidos en laboratorio.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la gráfica N° 1 se puede observar que los comportamientos y el crecimiento de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, por lo cual la curva nos indica el ciclo de crecimiento bacteriano en sus 4 etapas: fase de latencia que se da entre las primeras 8 horas donde las bacterias que sufrieron daños anteriormente, necesitan tiempo para recuperarse, fase exponencial que duró las 4 horas siguientes, en esta fase las bacterias están en su mejor etapa de desarrollo, empiezan a multiplicarse y es en esta fase el mejor momento para la realización de los ensayos, fase estacionaria las próximas 12 horas en donde las bacterias cesan el crecimiento y una fase final de muerte celular en donde hay acumulación de sustancias tóxicas que las llevan a la muerte bacteriana. (49)

Según el estudio de Rosalda y Ruth (2018), se obtuvo resultados similares en cuanto a la curva de crecimiento, en el cual se puede observar las curvas de desarrollo bacteriano. (11)

4.5.2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

4.5.2.1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.

4.5.2.1.1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana*.

TABLA N° 4.9 RESULTADOS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO”

HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC											
N°	CONCENTRACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO EN (mg/ 500uL)	Extracto hidroalcohólico seco de <i>Physalis peruviana</i> “aguaymanto”									CLASIFICACIÓN
		I (mm)	II (mm)	III (mm)	IV (mm)	VI (mm)	VI (mm)	VII (mm)	VIII (mm)	PROMEDIO (mm)	
1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Resistente
2	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Resistente
3	25	7	9	8	6	7	8	8	9	7.75	Resistente
4	75	14	12	16	17	14	13	15	13	12.85	Intermedio
5	125	24	23	25	22	24	23	21	25	23.71	Sensible
6	Control (listerine)	24	26	23	25	27	25	24	27	25.125	Sensible

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: I, II, III, ..., VII, VIII= número de pruebas

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.9 se muestran los resultados de la medición de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana. Según Gavilanes, Aguirre, Romero y Delgado (2019) clasifica la sensibilidad bacteriana por el método de Kirby Bauer de acuerdo a las medidas de los halos de inhibición, por lo que a la concentración de 75 mg/500uL, con un promedio de halo inhibición de 12.85 mm, se le clasifica dentro de un efecto intermedio. En cambio, a una concentración de 25mg/500uL, con el promedio de los halos de 7.75 mm, se clasifica como resistente siendo este ineficaz para el estudio. Por otro lado, a partir de una concentración de 125/500uL, con un promedio de halo de 23.71, se le clasifica como sensible. (71) Comparándolo con el estudio de Salas (2017) en donde se buscó determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Physalis peruviana* “aguaymanto” en relación con la acción de la clorhexidina sobre cepas de *Streptococcus mutans*, donde se obtuvo que el aceite esencial de *Physalis peruviana* a 75 y 100 % posee un efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*, con una medida de halos de inhibición de 13 y 14 mm respectivamente. Los resultados que se obtuvo no se diferencian mucho con los resultados del presente trabajo ya que a concentraciones de 75 y 125 mg/500uL se obtuvo halos de inhibición de sensibilidad bacteriana de 12.85 y 23.71 mm respectivamente, llegando así en ambos estudios que tanto el aceite como el extracto hidroalcohólico presenta actividad antibacteriana (18).

TABLA N° 4.10 RESULTADO DESCRIPTIVO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA De *Streptococcus mutans* FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO”

HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DEL AGUAYMANTO FRENTE A Streptococcus								
	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	95% intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Lower Bound	Upper Bound		
5 mg	8	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
15 mg	8	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
25 mg	8	7.7500	1.03510	.36596	6.8846	8.6154	6.00	9.00
75 mg	8	14.2500	1.66905	.59010	12.8546	15.6454	12.00	17.00
125 mg	8	23.3750	1.40789	.49776	22.1980	24.5520	21.00	25.00
Grupo Control (Listerine)	8	25.1250	1.45774	.51539	23.9063	26.3437	23.00	27.00
Total	48	11.7500	10.26769	1.48201	8.7686	14.7314	0.00	27.00

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.10 se muestra los resultados descriptivos del Test de ANOVA, de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana en donde se puede observar que a partir de una concentración de 75 mg presenta mejores halos de inhibición con una media de 14.25mm del extracto hidroalcohólico seco del aguaymanto frente a *Streptococcus mutans* ATCC, con una desviación estándar de 1.66. A una concentración de 25 mg posee un desviación estándar de 1.03 con una media de 7.75 mm siendo este muy bajo y ineficaz para el estudio, ya que se le clasifica como resistente. Comparando estos resultados con la investigación de Ortiz (2018), en donde a una concentración del 60% obtuvo una media de 10.35 mm y una desviación estándar de 1.13, estos resultados no se diferencian mucho con los resultados obtenidos en la presente investigación. (17)

TABLA N° 4.11 ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO”

ANOVA					
HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO FRENTE A <i>Streptococcus</i>					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4899.250	5	979.850	738.183	.000
Dentro de grupos	55.750	42	1.327		
Total	4955.000	47			

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

Leyenda:

Gl: Grados de libertad

Sig: Significancia

F: Distribución de Fisher

Sig \leq 0.05, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig \geq 0.05, no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.11 se desprende que, de acuerdo al análisis realizado en el software estadístico SPSS v.21, la prueba de ANOVA presenta un valor significativo de 0.00, con una media cuadrática dentro de grupos de 1.32 y con 47 grados de libertad. Dado que el valor de significancia es menor a 0.05 se puede afirmar que existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del extracto por lo cual al menos una concentración del extracto hidroalcohólico seco de aguaymanto presenta actividad in-vitro frente a *Streptococcus mutans* ATCC. Ortiz (2018), obtuvo en su investigación el valor de significancia < 0.05 confirmando así (al igual que la presente investigación) que el extracto de *Physalis peruviana* tiene efecto inhibitorio frente a cepas de *Streptococcus mutans*. (17)

TABLA N° 4.12 COMPARACIONES MULTIPLES DE DUNCAN DE LOS SUBCONJUNTOS DE LA SENSIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO”

HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175						
Duncan						
CONCENTRACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO EN (mg/500uL)	N	Subconjunto para alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
5 mg	8	0.0000				
15 mg	8	0.0000				
25 mg	8		7.7500			
75 mg	8			14.2500		
125 mg	8				23.3750	
Grupo Control (Listerine)	8					25.1250
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						

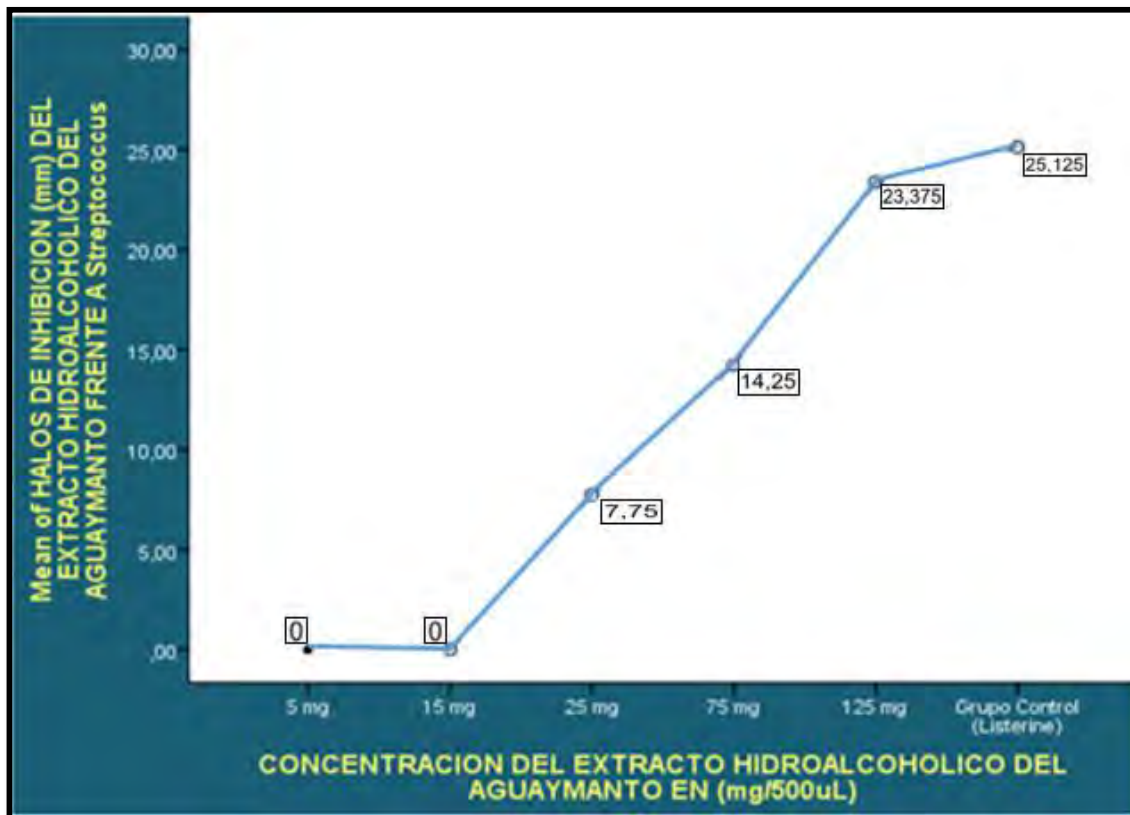
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

Leyenda:

Sig: Significancia

GRÁFICO N° 2 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Physalis peruviana* "AGUAYMANTO"



Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

De la tabla N° 4.12 se desprende que, de acuerdo al análisis realizado en el software estadístico SPSS v.21, la prueba Post Hoc Duncan los agrupa en 5 subgrupos, formados por las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico, siendo el primer subgrupo los que no presentan halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana a concentraciones de 5mg y 15mg; sin embargo a la concentración de 25mg se infiere que presenta una mínima sensibilidad bacteriana, a partir de concentraciones mayores a 75mg ya presentan mejores halos de inhibición en relación directa, por lo que a medida que incrementa las

concentraciones las diferencias de media se reducen tal es el caso para la concentración de 125mg tienen una diferencia de media con el control positivo (Listerine) de 1.75mm.

Según el grafico N° 2, se puede afirmar que a medida que incrementa la concentración de extracto hidroalcohólico seco también incrementa los halos de inhibición, siendo la concentración de 125mg la más cercana frente al grupo control (Listerine) con una diferencia de media de 1.75mm.

Comparando la tabla N° 4.12 y el grafico N° 2 con la investigación de Ortiz (2018) y Salas (2017) a igual que en la presente investigación, existe una relación directamente proporcional entre la concentración y los halos de inhibición, disminuyendo así la diferencia de media en comparación con el colutorio comercial. (17) (18)

4.5.2.1.2. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LA CEPA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “COLA DE CABALLO” *Equisetum bogotense kunth*.

TABLA N° 4.13 RESULTADOS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE *Streptococcus Mutans* FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175											
N°	CONCENTRACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO EN (mg/ 500uL)	Extracto hidroalcohólico seco de <i>Equisetum bogotense kunth</i> “cola de caballo”									CLASIFICACIÓN
		I (mm)	II (mm)	III (mm)	IV (mm)	VI (mm)	VI (mm)	VII (mm)	VIII (mm)	PROMEDIO (mm)	
1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Resistente
2	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Resistente
3	25	7	7	8	6	4	4	5	4	5.625	Resistente
4	75	11	14	11	10	10	8	10	9	10.72	Resistente
5	125	12	17	16	15	10	13	13	12	13.5	Intermedio
6	Control (listerine)	24	26	23	25	27	25	24	27	25.12	Sensible

Fuente: elaboración propia.

Leyenda: I, II, III, ..., VII, VIII= número de pruebas

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.13 se muestran los resultados de la medición de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana. Según Gavilanes, Aguirre, Romero y Delgado (2019) clasifica la sensibilidad bacteriana por el método de Kirby Bauer de acuerdo a las medidas de los halos de inhibición, por lo que a una concentración de 25mg/500uL, con el promedio de los halos de 5.6 mm y a la concentración de 75 mg/500uL, con un promedio de halo inhibición de 10.72 mm, se les clasifica dentro de un efecto resistente. En cambio, a una concentración de 125 mg/500uL, con un promedio de halo de inhibición de 13.5 mm, se le clasifica dentro de un efecto intermedio. (71) Comparándolo con el estudio de Cáceres (2018), donde se determinó la actividad antibacteriana in-vitro del extracto de *Equisetum arvense* cubierta sobre el *Streptococcus mutans* al 10, 25, 50, 100% del extracto obteniendo al 50% halos de inhibición de 9.93 mm y a una concentración del 100% un halo de inhibición de 12.23 mm, comparando estos resultados con los resultados obtenidos en el presente estudio en donde se obtuvo halos de inhibición de 10.72 y 13.5 a concentraciones de 75mg/500uL y 125mg/500uL respectivamente no existe diferencia por lo cual se infiere que el extracto de *Equisetum bogotense kunth* posee una actividad antibacteriana intermedia frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. (8)

TABLA N° 4.14 RESULTADO DESCRIPTIVO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DEL AGUAYMANTO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175								
	N	Media	Desviación Estándar	Error Estándar	95% intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Lower Bound	Upper Bound		
5 mg	8	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
15 mg	8	0.0000	0.00000	0.00000	0.0000	0.0000	0.00	0.00
25 mg	8	5.6250	1.59799	.56497	4.2890	6.9610	4.00	8.00
75 mg	8	10.3750	1.76777	.62500	8.8971	11.8529	8.00	14.00
125 mg	8	13.5000	2.32993	.82375	11.5521	15.4479	10.00	17.00
Grupo Control (Listerine)	8	25.1250	1.45774	.51539	23.9063	26.3437	23.00	27.00
Total	48	9.1042	8.91625	1.28695	6.5152	11.6932	0.00	27.00

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.14 se puede ver los resultados descriptivos del Test de ANOVA, de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana en donde se puede observar que a partir de una concentración de 75 mg presenta mejores halos de inhibición con una media de 10.37mm del extracto hidroalcohólico seco del cola de caballo frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con una desviación estándar de 1.76. A una concentración de 25 mg posee un desviación estándar de 1.59 con una media de 7.005 mm siendo este muy bajo para el estudio. En la investigación de Cáceres (2018), a una concentración de 50% del extracto de *Equisetum bogotense kunth* el promedio de halos de inhibición es 9.73 mm y su

desviación estándar es ± 0.19 y a una concentración al 100% el promedio de halos de inhibición es de 12,23 mm con una desviación estándar de 0,16 por lo que a mayor concentración del extracto hay un mayor promedio de halos de inhibición. (8)

TABLA N° 4.15 ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA) DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Equisetum arvense* "COLA DE CABALLO"

ANOVA					
HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3643.854	5	728.771	330.455	.000
Dentro de grupos	92.625	42	2.205		
Total	3736.479	47			

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

Datos:

Gl: Grados de la libertad

Sig: Significancia

F: Repartición de Fisher

Sig ≤ 0.05 , existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig ≥ 0.05 , no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.15 se desprende que, de acuerdo al análisis realizado en el software estadístico SPSS v.21, la prueba de ANOVA presenta un valor significativo de 0.00, con una media cuadrática dentro de grupos de 2.20 y con 47 grados de libertad. Pues el valor de significancia es mucho menor a 0.05 se puede afirmar que existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del extracto por lo cual al menos una concentración del extracto hidroalcohólico seco de cola de caballo presenta actividad in-vitro frente a

Streptococcus mutans ATCC 25175, al igual que en la investigación de Cáceres (2018), la sig<0.05 y asevera que la concentración al 100% del extracto de *Equisetum arvense*, se comporta mejor en relación a las concentraciones de 10, 25 y 50 % respectivamente. (8)

TABLA N° 4.16 COMPARACIONES MULTIPLES DE DUNCAN DE LOS SUBCONJUNTOS DE LA SENSIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Equisetum bogotense* kunth “COLA DE CABALLO”

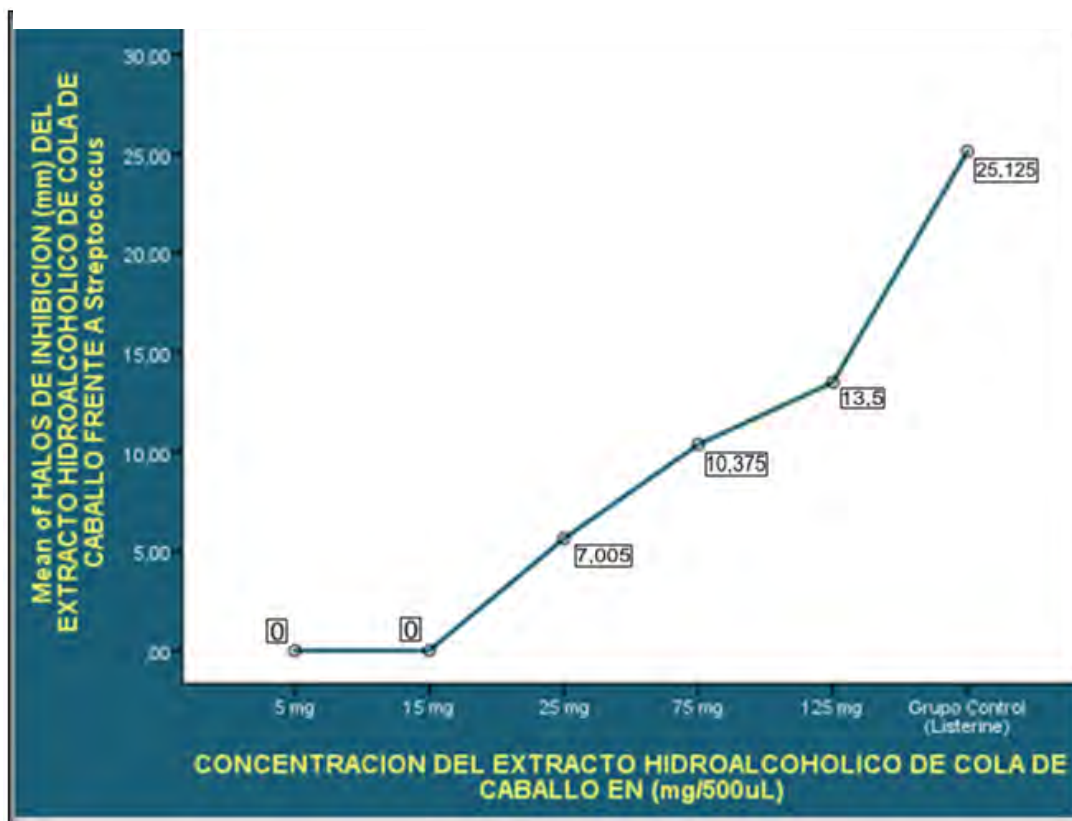
HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175						
Duncan						
CONCENTRACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO EN (mg/500uL)	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
5 mg	8	0.0000				
15 mg	8	0.0000				
25 mg	8		7.0050			
75 mg	8			10.3750		
125 mg	8				13.5000	
Grupo Control (Listerine)	8					25.1250
Sig.		1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.						
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000.						

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

Datos:

Sig: Significancia

GRÁFICO N° 3 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO de *Equisetum bogotense* kunth "COLA DE CABALLO"



Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

De la tabla N° 4.16 se desprende lo siguiente, de acuerdo al análisis realizado en el software estadístico SPSS v.21, la prueba Post Hoc Duncan los agrupa en 5 subgrupos, formados por las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico, siendo el primer subgrupo los que no presentan halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana a concentraciones de 5mg y 15mg; sin embargo a la concentración de 25mg se infiere que presenta una mínima sensibilidad bacteriana, a partir de concentraciones mayores a 75mg ya presentan mejores halos de inhibición en relación directa, por lo que a medida que incrementa las concentraciones las diferencias de media se reducen tal es el caso para la concentración de 125mg tienen una diferencia de media con el control positivo (Listerine) de 11.62 mm.


Según el grafico N° 3, se puede testificar que a medida que incrementa la concentración de extracto hidroalcohólico seco también aumenta los halos de inhibición, siendo la concentración de 125mg la más cercana frente al grupo control (Listerine) con una diferencia de media de 11.625mm.

Comparando la tabla N° 4.16 y el grafico N° 3 con la investigación de Cáceres (2018) al igual que en la presente investigación, existe una relación directamente proporcional entre la concentración y los halos de inhibición, disminuyendo así la diferencia de media en comparación con el colutorio comercial, como por ejemplo se evidencia que a una concentración a 100% hay una mayor actividad in vitro. (8)

4.5.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR EL PROCEDIMIENTO DE MACRODILUCIÓN.

4.5.2.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana*.

TABLA N° 4.17 RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175

CONCENTRACION MINIMA DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DE <i>Physalis peruviana</i> “AGUAYMANTO” FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175						
N°	CONCENTRACION DE PRINCIPIO ACTIVO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DILUIDO	CUANTIFICACIÓN DEL N° DE BACTERIAS				
		CLASIFICACIÓN				
		SIN TURBIDEZ	BUENA ACTIVIDAD	MODERADA ACTIVO	POCO ACTIVO	INACTIVO
1	32 mg/mL	Sin turbidez	Buena actividad			
2	16 mg/mL  CMI	Sin turbidez	Buena actividad			
3	8 mg/mL	Con turbidez		Moderada actividad		
4	4 mg/mL	Con turbidez			Poco activo	
5	2 mg/mL	Con turbidez			Poco activo	
6	1 mg/mL	Con mayor turbidez				Inactivo
7	0.5 mg/mL	Con mayor turbidez				Inactivo
8	0.25 mg/mL	Con mayor turbidez				Inactivo


Fuente: Elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.17 se observa el siguiente resultado de la CMI del extracto hidroalcohólico seco de *Physalis peruviana* “aguaymanto” frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, según Taroco (2007) la CMI incumbe a la mínima concentración del antibiótico, donde no será observable algún desarrollo de turbidez. A partir de la concentración de 16 mg/mL, no se observa turbidez llegando a la conclusión que es la concentración mínima inhibitoria que utilizaremos para la elaboración del colutorio. (51)

4.5.2.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “COLA DE CABALLO” *Equisetum bogotense kunth*.

TABLA N° 4.18 RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO” FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC 25175

CONCENTRACION MINIMA DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DE COLA DE CABALLO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175						
N°	CONCENTRACION DE PRINCIPIO ACTIVO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DILUIDO	CUANTIFICACIÓN DEL N° DE BACTERIAS				
		CLASIFICACIÓN				
		SIN TURBIDEZ	BUENA ACTIVIDAD	MODERADA ACTIVIDAD	POCO ACTIVO	INACTIVO
1	32 mg/mL  CMI	Sin turbidez	Buena actividad			
2	16 mg/ mL	Poca turbidez		Moderada actividad		
3	8 mg/mL	Poca turbidez			Poco activo	
4	4 mg/mL	Con turbidez			Poco activo	
5	2 mg/mL	Con mayor turbidez			Inactivo	
6	1 mg/mL	Con mayor turbidez			Inactivo	
7	0.5 mg/mL	Con mayor turbidez			Inactivo	
8	0.25 mg/mL	Con mayor turbidez			Inactivo	

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.18 se observa el resultado de la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico seco de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, según Taroco (2007) la CMI incumbe a la mínima concentración del antibiótico en donde no hay desarrollo alguno de turbidez. A partir de la concentración de 32 mg/mL, no se observa turbidez llegando a la conclusión que es la concentración mínima inhibitoria que utilizaremos para la elaboración del colutorio. (51)

4.6. FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DEL COLUTORIO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana* Y “Cola De Caballo” *Equisetum bogotense kunth*.

TABLA N° 4.19 FORMULA UNITARIA DEL COLUTORIO EN BASE A LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

	PORCENTAJE	Pre formulación I	Pre formulación II	Pre formulación III	Pre formulación IV	FORMULACIÓN FINAL
Texapón	1%	1.3 MI	1	0.5	0.8	0.5 mL
Glicerina	13%	7.36	7.36	8	9	6.5 mL
Sorbitol	1.2%	0.6	0.6	1	0.9	0.6 mL
Sacarina	2%	0.02	0.2	0.4	1	1.0 mL
Sabor menta	0.2%	0.9	0.9	0.4	0.4	0.1 mL
Extracto hidroalcohólico seco de cola de caballo	2%	32 mg / 1mL	32 mg / 1mL	32 mg / 1mL	32 mg / 1mL	32 mg / 1mL
Extracto hidroalcohólico seco de aguaymanto	2%	16 mg /1 mL	16 mg /1 mL	16 mg /1 mL	16 mg /1 mL	16 mg /1 mL
Agua	78.6%	C.S.P (50 mL)	C.S.P (50 mL)	C.S.P (50 mL)	C.S.P (50 mL)	C.S.P (50 mL)
Total	100%	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

Fuente: elaboración propia.

4.6.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FISCOQUIMICAS DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana* Y “Cola De Caballo” *Equisetum bogotense kunth*.

En la determinación de las pruebas de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos de “Aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se obtuvieron los siguientes resultados

TABLA N° 4.20 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL COLUTORIO ELABORADO

	COLUTORIO ELABORADO	
	ORGANOLEPTICAS	COLOR
OLOR		Menta agradable
SABOR		Dulce ligeramente picante
APARIENCIA		Translucido
FISCOQUIMICAS	DENSIDAD	1.026 g/mL
	pH	6.5

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.20 se muestra las características organolépticas y fisicoquímicas del colutorio elaborado con los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”, donde se aprecia que tiene un color verde claro, con un olor a menta, un sabor dulce ligeramente picante que es tolerable para su aplicación sin dejar una sensación de sabor desagradable en la cavidad oral, una apariencia translúcida, se obtuvo un pH de 6.5 (ligeramente ácido) que permite la seguridad de su uso según Alonso, Irache y Locasa (2001) el pH de la cavidad oral es de 6.8 a 7 y una alteración del pH por el uso del colutorio deterioraría el esmalte dentario y el pH alcalino llega a dañar o perjudicar los tejidos gingivales, favoreciendo así la aparición de caries. (58)

4.6.2. PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana* Y “Cola De Caballo” *Equisetum bogotense kunth*, FRENTE A LA CEPA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

4.6.2.1. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DEL COLUTORIO POR EL METODO DE DIFUSIÓN EN DISCO.

TABLA N° 4.21 RESULTADO DEL EFECTO DE LA ACCIÓN ANTIBACTERIAL DEL COLUTORIO ELABORADO SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

N°	COLUTORIOS	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			PROMEDIO	CLASIFICACIÓN
			Dato 1	Dato 2	Dato 3		
COLUTORIO ELABORADO							
1	Sin principio activo	0 mg	5	7	7	6.3	Resistente
2	Con extracto hidroalcohólico seco de: ➤ <i>Physalis peruviana</i> ➤ <i>Equisetum bogotense kunth</i>	➤ 16mg ➤ 32 mg	19	20	19	19.3	Sensible
ENJUGUE COMERCIAL							
3	Listerine		20	23	22	21.6	Sensible
INSUMOS UTILIZADOS							
4	Glicerina	6.5 ml	3	4	2	3	
5	Texapón k70	0.5 ml	2	3	3	2.6	
6	Sacarosa	1.0 ml	0	0	0	0	
7	Sorbitol	0.6 ml	0	0	0	0	
8	Sabor menta	0.1 ml	2	2	2	2	

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.21 se puede ver los resultados de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al colutorio elaborado, donde se observa que el halo del colutorio listerine tiene un diámetro promedio de 21.6 mm siendo mayor al colutorio elaborado con los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” con un diámetro promedio de 19.3 mm, cuya diferencia entre los halos no es muy distante, por lo cual se podría asumir que la acción del colutorio elaborado es similar al colutorio comercial. Se puede observar que la medida de los halos de inhibición del colutorio comercial (listerine), tienen una similitud con los resultados obtenidos por Raul F. (23)

También se observa los halos de inhibición de la sensibilidad de los insumos utilizados en la elaboración del colutorio, los que presentan halos de inhibición bacteriana son la glicerina con un diámetro promedio de 6.3 mm seguido por el Texapón k70 con un diámetro promedio de 6.5 mm, los cuales le confieren la actividad antibacteriana al colutorio sin principio activo.

TABLA N° 4.22 RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO” SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175

DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)						
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Sin principio activo	3	6.3333	1.15470	.66667	5.00	7.00
Con extracto hidroalcohólico seco de: (Aguaymanto; cola de caballo)	3	19.3333	.57735	.33333	19.00	20.00
Listerine	3	21.6667	1.52753	.88192	20.00	23.00
Total	9	15.7778	7.22457	2.40819	5.00	23.00

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el cuadro 4.22 se analiza los resultados descriptivos de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al colutorio elaborado con los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” comparado con un colutorio comercial listerine, observándose el valor mayor del colutorio listerine con 21.6667 mm referente al colutorio elaborado con un valor 19.3333 mm, en comparación con Moina (2015) donde realizo colutorios con especies vegetales como “yuraq muña” y “arrayan” obtuvo diámetros menores de halos de inhibición de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente a colutorios elaborados. (9)

TABLA N° 4.23 ESTUDIO DE LA VARIANZA (ANOVA) DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

ANOVA					
DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	409.556	2	204.778	153.583	.000
Within Groups	8.000	6	1.333		
Total	417.556	8			

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

Leyenda:

Gl: Grados de libertad

Sig: Significancia

F: Distribución de Fisher

Sig ≤ 0.05, existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig ≥ 0.05, no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

De la tabla N° 4. 23 se desprende que, de acuerdo al estudio realizado en el software estadístico SPSS v.21, la prueba del ANOVA presenta un valor significativo de 0.00, con una media cuadrática dentro de grupos de 1.33 y con 8 grados de libertad. Dado que el valor significativo es menor a 0.05 se puede afirmar que existe al menos un grupo que presenta actividad in-vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 al igual que Moina (2015) donde la sig<0.05 se afirma que existe diferencia significativa entre los halos de inhibición de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente a los colutorios elaborados con los aceites esenciales. (9)

TABLA N° 4.24 COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DE LA SENSIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Del Colutorio Comercial Listerine Frente Al Colutorio Sin Principio Activo Y Del Colutorio Elaborado Con Los Extractos Hidroalcohólicos De *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” Y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

COMPARACIONES MÚLTIPLES							
Variable Dependiente:		DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)					
(I) COLUTORIOS (Aguaymanto y cola de caballo)			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Listerine	Sin principio activo	15,33*	.94	.000	12.44	18.22
		Con extracto hidroalcohólico seco de: (Aguaymanto; cola de caballo)	2.33	.94	.105	-.55	5.22

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

De la tabla N° 4. 24 se desprende que, de acuerdo al análisis realizado en el software estadístico SPSS v.21, la prueba Post Hoc Tukey HSD, el colutorio elaborado presenta un valor significativo de 0.105, con una diferencia de media de 2.33mm. Dado que el valor significativo $\text{sig} > 0.05$ se puede afirmar que el colutorio elaborado y el colutorio comercial listerine presenta similar actividad in-vitro frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, no existiendo diferencia significativa entre las medias a diferencia de Aguilar, Rendon (2018) el valor $\text{sig} < 0.05$ existe diferencia significativa entre los halos de inhibición formados por los colutorios comerciales y colutorios elaborados en base a aceites esenciales. (11)

TABLA N° 4.25 COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY DE LOS SUBCONJUNTOS DE LA SENSIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* "AGUAYMANTO", *Equisetum bogotense kunth* "COLA DE CABALLO" Y COLUTORIO COMERCIAL

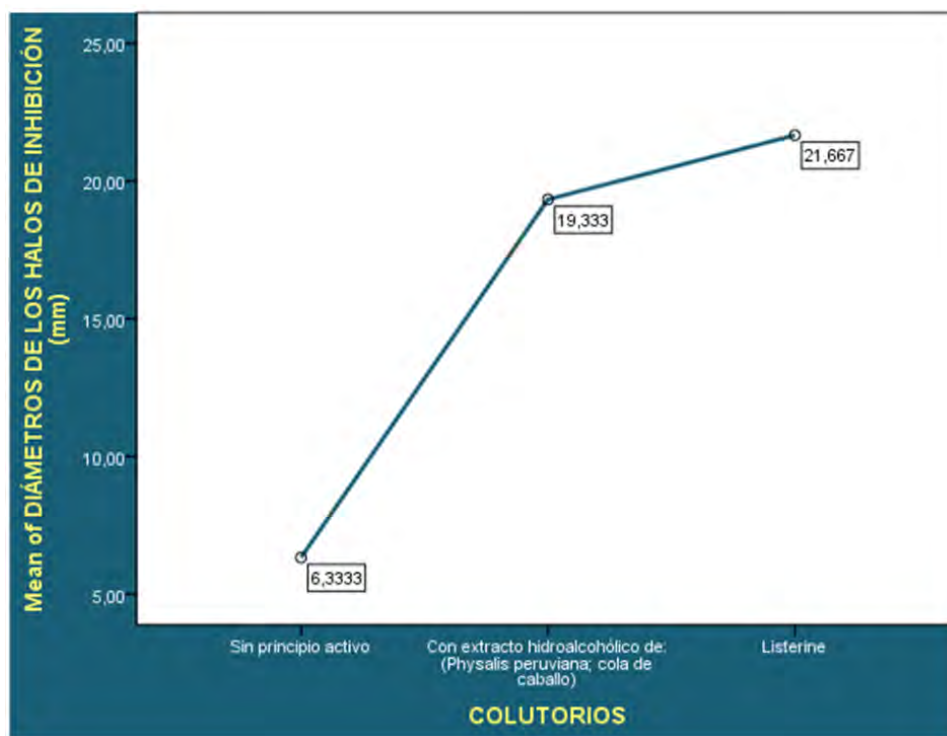
COLUTORIOS (Aguaymanto y cola de caballo)		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	Sin principio activo	3	6.3333	
	Con extracto hidroalcohólico seco de: (aguaymanto; cola de caballo)	3		19.3333
	Listerine	3		21.6667
	Sig.		1.000	.105

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

De la tabla N° 4. 25 se desprende que, de acuerdo al análisis realizado en el software estadístico SPSS v.21, la prueba Post Hoc tukey los agrupa en 2 subgrupos, en la cual la media del colutorio sin principio activo es 6.3333 muy diferente en comparación al grupo del colutorio elaborado y del colutorio listerine cuyas medias son de 19.3333 y 21.6667 respectivamente, por lo cual se deduce que la acción del colutorio elaborado y el colutorio listerine es similar ya que no existe gran diferencia entre sus medias, a diferencia de la investigación de Aguilar y Rendon (2018) en donde la media de los colutorios elaborados y los colutorios comerciales no se asemejan. (11)

GRÁFICO N° 4 ESTUDIO DE LA VARIANZA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 FRENTE AL COLUTORIO ELABORADO



Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el grafico N° 4, se puede afirmar que el colutorio formulado mediante los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto y cola de caballo presenta similar actividad in-vitro frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ($p > 0.05$), con una diferencia de media de 2.33mm,

lo contrario a la investigación de Aguilar y Rendon (2018) en donde la actividad del colutorio elaborado y los colutorios comerciales no se asemejan. (11)

4.6.3. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL COLUTORIO ELABORADO CON EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO SECO DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana* Y “Cola De Caballo” *Equisetum bogotense kunth*.

El colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de “aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, estuvieron obligados a exámenes de ensayos microbiológicos obligatorias para efectuar con los requisitos. Las pruebas microbiológicas una vez realizada fueron certificados por la institución pertinente. Ver anexo N° 2.

TABLA N° 4.26 RESULTADOS DE CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL COLUTORIO ELABORADO A BASE DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE “AGUAYMANTO” *Physalis peruviana* Y “COLA DE CABALLO” *Equisetum bogotense kunth*

Criterios	COLUTORIO ELABORADO		Límites permisibles
	UNIDAD	RESULTADOS	
Numeración de aerobios mesófilos Recuento estándar en placas estimado	UFC/mL	<10	10 ² UFC/g
Numeración de colifórmes	NMP/mL	<3	10 ² – 40 ² UFC/g
Numeración de Escherichia coli	NMP/mL	<3	10 ² – 40 ² UFC/g
Numeración de Mohos Recuento estándar en placa estimado	UFC/mL	<10	10 ¹ UFC/g
Numeración de levaduras Recuento estándar en placa estimado	UFC/mL	<10	10 ¹ UFC/g

Detención de salmonella en 25 ml	-	AUSENTE	10 ¹ UFC/g

Fuente: Datos obtenidos de la constancia de análisis microbiológico.

Leyenda:

- UFC: Unidades Formadoras De Colonias
- NMP: Número Más Probable
- G: Gramo
- mL: Mililitros

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4. 26 se muestran los resultados de control microbiológico del colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo, los cuales indican que las muestras se encuentran libres de recuento de Aerobios mesófilos, Coliformes, Escherichia coli, Mohos, Levaduras y Salmonella, por lo que podemos afirmar que nuestro colutorio elaborado está libre de contaminación microbiológica, cumpliéndose así la normativa de los límites permisibles de acuerdo a la USP 40 NF35. (59)

4.7. IRRITACION DE LA MUCOSA ORAL

4.7.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Para la determinación de la irritabilidad del colutorio elaborado con el extracto hidroalcohólico seco de “aguaymanto” *Physalis peruviana* y “cola de caballo” *Equisetum bogotense kunth*, se contó con 9 animales de experimentación (Hámsteres sirios machos), con un peso de 30 a 60 g. lo cual se procedió a los observaciones macroscópicas y microscópicas.

4.7.1.1. OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS

TABLA N° 4.27 REGISTRO DE OBSERVACIONES MACROSCOPICAS

Grupo	Animal	Obs 0	Obs 1	Obs 2	Obs 3	Obs 4	Obs 5	Obs 6	promedio
Control	1	0	0	1	0	0	0	0	0.17
	2	0	0	0	0	0	0	0	0.00
	3	0	0	0	1	0	0	0	0.17
Promedio									0.11
Listerine	1	0	0	0	0	0	1	1	0.34
	2	0	0	0	0	1	1	2	0.50
	3	0	0	0	0	0	0	1	0.17
promedio									0.34
Colutorio	1	0	0	0	0	0	0	1	0.17
	2	0	0	0	0	0	0	1	0.17
	3	0	0	0	0	0	1	1	0.34
Promedio									0.23

Fuente: elaboración propia.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4. 27 se exponen las observaciones macroscópicas realizadas antes de comenzar el presente estudio y posteriores a cada administración, en la columna (Obs 0), la cual esta sombreada no se tomaron en cuenta para el cálculo de promedio de cada grupo de ensayo, pero si se tomó en consideración para las comparaciones posteriores realizadas a cada animal de experimentación. El promedio de las muestras ensayadas es menor a 1 cuando se resta el promedio de los grupos listerine y colutorio con el grupo control, por lo que se considera que no existe irritación del colutorio elaborado en la observación macroscópica, comparándolo con la clasificación numérica de la observación de la irritabilidad de la guía metodológica de la Organización Internacional de Normalización ISSO 10993-10 (tabla 3.12).

En la fila sombreada de verde se puede observar que a partir del día numero 4 el animal de experimentación ya no participa en la prueba ya que este falleció por muerte natural.

TABLA N° 4.28 ESTIMACIÓN DEL VALOR SIGNIFICATIVO DE LA OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA MEDIANTE EL TEST DE FRIEDMAN

Test Statistics ^a	
N	21
Chi-Square	3.071
Df	2
Asymp. Sig.	.215
a. Friedman Test	

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

Sig= 0.215

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4. 28 se puede ver que tiene un valor de significancia >0.05 entonces aceptamos la hipótesis nula; por lo tanto, no existe diferencia significativa del colutorio con el control negativo (agua destilada) y positivo (listerine), por lo que se infiere que el colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto (*Physalis peruviana*) y cola de caballo (*Equisetum bogotense kunth*) no tienen efecto irritante de la mucosa oral en animales de experimentación, según la prueba macroscópica, al igual que en la

investigación de Aguilar y Rendon (2018), los colutorios elaborados con los aceites esenciales de paico, chicchipa no presentan irritación alguna en los animales de experimentación. (11)

4.7.1.2. OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS

TABLA N° 4. 29 REGISTRO DE OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Grupo	Animal	Epitelio	Infiltración de leucocitos	Congestión vascular	Edema	Total	Media
Control agua destilada	1	0	0	0	1	1	0.25
	2	0	0	0	1	1	0.25
	3	-	-	-	-	-	-
Total						2	
Media							0.25
Listerine	1	0	0	0	0	0	0.00
	2	0	0	1	1	2	0.5
	3	0	0	1	1	2	0.5
Total						4	
Media							0.33
Colutorio elaborado	1	0	0	1	0	1	0.25
	2	0	0	0	0	0	0.00
	3	0	0	1	0	1	0.25
Total						2	
Media							0.16

Fuente: Datos obtenidos de la constancia de análisis histopatológico.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4. 29 se muestran las observaciones microscópicas realizadas mediante un examen laboratorial, donde se incluyen los criterios de estudio histopatológicos y su calificación numérica respectiva, en la cual se obtuvieron los promedios para el análisis del índice de irritación. Comparándolo con los criterios de estudio histopatológico de la guía metodológica de la Organización Internacional de Normalización ISSO 10993-10 en la (tabla 3.14)

En la fila número 3 del grupo control agua destilada ya no participa en la prueba ya que este falleció por muerte natural.

TABLA N° 4.30 ESTIMACIÓN DEL VALOR SIGNIFICATIVO DE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO MEDIANTE EL TEST DE FRIEDMAN

Test Statistica	
N	3
Chi-Square	2,000
Df	1
Asymp. Sig.	,157
a. Friedman Test	

Fuente: Datos estadísticos SPSS v.21.

Sig= 0.157

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4.30 se puede ver que tiene un valor de significancia > 0.05 entonces aceptamos la hipótesis nula; por lo tanto, no existe diferencia significativa del colutorio con el control negativo (agua destilada) y positivo (listerine), por lo que se infiere que el colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto (*Physalis peruviana*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*) no tienen efecto irritante de la mucosa oral en animales de experimentación, según la prueba microscópica.

Según el estudio de Aguilar y Rendon (2018) donde se evaluó la posible irritación de la mucosa oral de un colutorio en animales de experimentación, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se puede afirmar el modelo animal empleado, la

dosis utilizada y bajo las condiciones experimentales observadas la solución de colutorio elaborado reflejo una respuesta irritante nula sobre la mucosa oral en los animales de experimentación lo que se clasifica a esta sustancia como no irritante. (11)

4.7.1.3. INDICE DE IRRITACIÓN

TABLA N° 4.31 ÍNDICE DE IRRITACIÓN

GRUPO	GRADUACION MEDIA (GM)	INDICE DE IRRITACIÓN (GM - 0.25)	DESCRIPCIÓN DE LA RESPUESTA
GRUPO 2 (LISTERINE)	0.33	0.08	NINGUNA
GRUPO 3 (COLUTORIO)	0.16	0.09	NINGUNA

Fuente: Datos obtenido del cuadro del examen microscópico.

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la tabla N° 4. 31 de acuerdo a los resultados obtenidos se infiere que, a la dosis utilizada y bajo las condiciones experimentales que se mantuvo en los animales de experimentación, divididos en 3 grupos, durante un periodo de 7 días por 4 horas seguidas aplicadas por 5 minutos consecutivas, el colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”, no tiene respuesta irritante, comparándolo con la tabla de clasificación de acuerdo al índice de irritación de la guía metodológica de la Organización Internacional de Normalización ISSO 10993-10 en la (tabla 3.15), clasificándose al colutorio elaborado con respuesta irritante 0 (ninguna)

CONCLUSIONES

1. Teniendo como base los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” se realizó la formulación de un colutorio, lográndose determinar la actividad in-vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, la que presenta una similar actividad antibacteriana al colutorio listerine y se obtuvo un resultado no irritante del colutorio elaborado.
2. El porcentaje de humedad que se obtuvo de ambas especies vegetales *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” fueron de 86.6% y 7.39% respectivamente y posteriormente mediante la técnica de maceración se obtuvo el extracto hidroalcohólico de ambas especies vegetales.
3. Dentro de las características organolépticas, sus propiedades fisicoquímicas y las pruebas de solubilidad de ambos extractos hidroalcohólicos se obtuvo para el fruto *Physalis peruviana* “aguaymanto” una densidad de 1.017 g/mL con un pH de 3.0 y mediante la marcha fitoquímica se obtuvo que presentan metabolitos secundarios como lactonas, flavonoides y fenoles. En cambio, el extracto de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” presentó un resultado en su densidad de 0.9281 g/mL teniendo un pH de 6.0 y mediante la marcha fitoquímica se determinó que tiene componentes mayoritarios como quinonas, taninos, flavonoides y fenoles.
4. Mediante la prueba de Kirby Bauer, se evaluó la sensibilidad bacteriana de *Streptococcus mutans* frente al extracto hidroalcohólico seco de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y extracto hidroalcohólico seco de *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” donde se logró observar halos de sensibilidad a concentraciones de 75mg/500uL para ambos extractos, con un promedio de halos de inhibición de 12.85 mm para *Physalis peruviana* “aguaymanto” y 10.72 mm para *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo”.
5. La concentración mínima inhibitoria CMI de los extractos hidroalcohólicos por el método de macrodilución para *Physalis peruviana* “aguaymanto” fue de 16 mg/mL y para *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” fue de 32 mg/mL ante la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
6. Teniendo como base los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” y *Equisetum bogotense kunth* “cola de caballo” se realizó la formulación y elaboración de un colutorio teniendo en cuenta la concentración mínima inhibitoria CMI.

7. El diámetro promedio de los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente al colutorio elaborado fue de 19.3mm.
8. Dentro de las características fisicoquímicas, organolépticas y microbiológicas del colutorio elaborado se obtuvo resultados de 1.026 g/mL para la densidad, con un pH de 6.5, con una apariencia translúcida y lográndose determinar que está libre de agentes de contaminación bacteriana.
9. Mediante una evaluación histopatológica en los animales de experimentación, se determinó que no existe irritación por lo cual se deduce que el colutorio elaborado se clasifica como no irritante.

SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

A TODAS LAS AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO (UNSAAC).

- ❖ Solicitar la obtención de nuevos equipos y la respectiva capacitación hacia la utilización para el estudio y aprendizaje.
- ❖ Agilizar la adquisición de materiales e insumos de laboratorio ya que son necesarios para un trabajo eficiente.
- ❖ Incentivar a la profundización de investigaciones como la presente con diferentes concursos científicos, tanto en la región como a nivel nacional ya que el Perú es un país rico en la diversidad de especies vegetales con diferentes acciones farmacológicas.
- ❖ Apoyar al egresado en el trámite de sus documentos ya que esta demora mucho.

A LOS DOCENTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.

- ❖ Proporcionar la capacitación requerida para la utilización de los equipos de laboratorio ya que estos serán utilizados posteriormente en trabajos de investigación científica y en campo laboral así se evitará errores en la manipulación de estos.
- ❖ Promover la formulación y producción de productos asépticos para la salud oral como, por ejemplo, pastas o crema dental, enjuagues bucales incluyendo como principio activo extractos hidroalcohólicos obtenidos de diferentes especies vegetales de nuestra región, en las diferentes prácticas de laboratorio.

A LOS ESTUDIANTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.

- ❖ Se sugiere investigar las diferencias y efectos farmacológicos de las plantas de nuestra región en especial para las enfermedades buco dentales ya que son muy poco estudiadas y puede ser de gran ayuda hacia la población.
- ❖ Incentivar al interés por la investigación científica en las diferentes ramas de la formación profesional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Huertas Campos MC. EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO Y CITOTÓXICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Physalis peruviana* (CAPULÍ) SOBRE CEPAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC25175), *STREPTOCOCCUS SANGUINIS* (ATCC 10556). tesis. Lima: Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Facultad de Ciencia de la Salud; 2015.
2. Neira Jara VE. Comparacion de la actividad antibacteriana del aceite esencial *Schinus molle* y *Thymus vulgaris* con el gluconato de clorxedina al 0.12 % frente a *Porphyromona gingivalis*. Estudio invitro. Tesis. Lima: Universidad Norbert Winer, Facultad de ciencias de la salud; 2019.
3. Huanca Camargo Y, Jaimes Zacarías PF, Ávila Parco J. Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de las hojas de la *Mentha spicata* (hierba buena) contra cultivos de *Cándida albicans*. Tesis. Lima: Universidad Interamericana (UNID), FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD CP Farmacia y Bioquímica; 2018.
4. Calle QM. Minsa.gob.pe. [Online].; 2017 [cited 2020 Septiembre 19. Available from: https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13.
5. Cabrera I. Super foods Perú. [Online].; 2016 [cited 2020 enero 11. Available from: https://peru.info/es-pe/superfoods/detalle/super-aguaymanto?fbclid=IwAR3EwpJVIAmlaElf_xZO7BnOHmuvM990hdCxXQlOG_Wyf0bqZeCrpCLjGd4.
6. Encinas G. Portal Odontólogos. [Online].; 2016 [cited 2020 enero 11. Available from: <http://www.odontologos.com.mx/gustavoencinas>.
7. Espinoza SM, Leon Manco RA. Prevalencia y experiencia de caries dental en estudiantes, segun facultades de una uniersidad particular peruana. Revista estomatologica Herdiana. 2015 Julio; 25(3).
8. Caceres Lupaca K. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO DE *Equisetum arvense* (COLA DE CABALLO) SOBRE EL *Streptococcus mutans*, PUNO – 2018. tesis. Puno: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO, FACULTAD DE ENFERMERÍA; 2018.
9. Moína Gallegos V. Actividad antibacteriana in vitro de colutorios elaborados con aceites esenciales de *Luma chequen* (*Feuillee ex Molina*) A. Gray “ARRAYAN” Y *Minthostachys spicata* (Benth). Epling “YURAQ MUÑA” frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. tesis. Cusco: UNSAAC, Escuela profesional de farmacia y bioquímica; 2015.
- 10 Martínez LN. la evolucion del uso del colutorio. [Online].; 2015 [cited 2020 enero 9. . Available from: www.propdental.es/blog/odontologia/la-historia-del-colutorio.

- 11 Aguilar Firata M, Rendon Anaya R. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE . ESENCIAL DE Dysphania Ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants (paico) y Tagetes Multiflora Kunth (chicjchipa) FRENTE A LA CEPA DE Streptococcus Mutans Atcc 25175, ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA Y EVALUACIÓ. tesis. Cusco: UNSAAC, Facultad de Ciencias de la Salud EP. Farmacia y Bioquimic; 2018.
- 12 Vieira D. Clinicas Propdental. [Online].; 2015 [cited 2020 enero 11. Available from: . <https://www.propdental.es/blog/odontologia/caries-en-la-historia/?fbclid=IwAR1W4rd4PxumgNKgwsaFz7icefsZ5b2SSGjTaGMW0nb9tEfbwOi9IbUXuSE>.
- 13 Narvaez F. Saludeo. [Online].; 2019 [cited 2020 enero 11. Available from: . <https://www.saludeo.com/propiedades-beneficios-medicinales-aguaymanto-salud/>.
- 14 Robles Lujan D. Aguaymanto conoce las 8 propiedades de la milagrosa fruta. CORREO. . 2020 enero.
- 15 Nuñez I. ecoagricultor. [Online].; 2019 [cited 2020 enero 18. Available from: . <https://www.ecoagricultor.com/fitoterapia-las-propiedades-y-usos-de-la-cola-de-caballo/>.
- 16 Fdez R. Salud.ideal.es. [Online].; 2018 [cited 2020 enero 18. Available from: . <https://salud.ideal.es/masmusculo/2254-para-que-sirve-la-cola-de-caballo-beneficios-y-propiedades.html>.
- 17 Ortiz Velasco D. ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE LA UVILLA . (Physalis peruviana) SOBRE CEPAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS. Tesis. Quito : Universidad Central de Ecuador, Facultad de odontologia; 2018.
- 18 Salas Romero SS. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE Physalis peruviana . VS CLORHEXIDINA SOBRE CEPAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS. Tesis. Quito: Universidad Central de Ecuador, Facultad de odontologia; 2017.
- 19 Neira Osorio KF. ANÁLISIS IN VITRO DE TRES DENTÍFRICOS CON AGENTES . ANTIBACTERIANOS Y SU EFICACIA FRENTE A STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175) Y LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS (ATCC 4356)". tesis. Quito: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, Facultad de Odontologia; 2016.
- 20 Baez Benavides MA. Evaluacion de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y . metanólicos de cola de caballo (equisetum arvense) sobre Aeromas spp y Staphylococcus aereus. tesis. Bogota: Fundación universitaris Juan Castellanos , Facultad de ciencias agrarias; 2015.
- 21 Sandoval Perez PC. Efecto inhibidor del colutorio de ciruela pas sobre Streptococcus . Mutans y lactobacillus acidophilus y comparacion con dos colutorios comerciales. Tesis. Quito: Universidad Central del Ecuador, Facultad de odontologia; 2015.

- 22 Franco Ospina LA, Matiz Melo E, Pajaro Bolivar IB, Gomez Estrada HA. Actividad . antibacteriana in vitro de extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. *Caesalpinia pulcherrima*. Boletín Latinoamericano de plantas medicinales y aromáticas. 2015 mayo; XII(3).
- 23 FERNANDEZ PAZ RR. DIFERENCIAS DEL EFECTO INHIBIDOR DE UN COLUTORIO HECHO A . BASE DE ALOE VERA, LISTERINE Y ORAL B SOBRE EL *STREPTOCOCCUS MUTANS* Y *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*. TESIS. MOQUEGUA: UNIVERSIDAD JOSE CARLOS MARIATEQUI, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD; 2018.
- 24 Uriol Plasencia DE. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS . HIDROALCOHÓLICOS DE FRUTOS DE AGUAYMANTO (*Physalis peruviana* L.) Y DE HOJAS DE EUCALIPTO (*Eucalyptus globulus* Labill) FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*. tesis. Trujillio: Universidad Privada Antenor Orrego, Facultad de medicina humana; 2019.
- 25 Chacaltana Ramos LJ, Huayanca Gutierrez IC. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EX- . TRACTO ETANÓLICO DEL FRUTO DE *Physalis peruviana* L. (AGUAYMANTO). boletín informativo. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2017.
- 26 Calsin Huayta YM. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA “In vitro” DEL ACEITE ESENCIAL Y . EXTRACTO ETANÓLICO DE *Equisetum arvense* “COLA DE CABALLO” FRENTE A *Escherichia coli* Y *Candida albicans* UROPATÓGENAS. TESIS. PUNO: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO, FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS; 2017.
- 27 JARA ESTRADA V. EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO, DE LA *Acicarpa tribuloides* Juss . (ESTRELLA KISKA) FRENTE AL *Streptococcus mutans*. TESIS. CUSCO: UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO, CUSCO; 2017.
- 28 BACA ZANS LK, YABAR FLUKER A. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LOS ACEITES . ESENCIALES DE *FOENICULUM VULGARE* (HINOJO), *CIMBOPOGON CITRUS* (HIERBA LUISA), *ORIGANUM VULGARE* (OREGANO), *CITRUS AURANTIFOLIA* SWINGLE (LIMÓN) Y *CITRUS SINESIS* (NARANJA), FRENTE A *STREPTOCOCCUS MUTANS*. tesis. Cusco: Universidad Andina del Cusco, Facultad de ciencias de la Salud; 2016.
- 29 ISLA PELÁEZ. CONTROL BIOLÓGICO DEL *Meloidogyne incognita* EN AGUAYMANTO . (*Physalis peruviana* L.) POR BACTERIAS PROMOTORAS DE CRECIMIENTO Y HONGOS ENDOMICORRÍZICOS”. Tesis. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias; 2016.
- 30 Tacanga Ramirez WA. Características y propiedades funcionales de *Physalis peruviana* . "aguaymanto". Tesis. Trujillio: Universidad Nacional de Trujillio, Facultad de ciencias agropecuarias; 2015.

- 31 Romero Reyes. Toxicidad oral aguda del extracto etanólico del fruto de Aguaymanto . liofilizado (*Physalis peruviana* L.) en Ratones (*Mus musculus*). Tesis. Cajamarca: Universidad Nacional de Cajamarca, Facultad de ciencias veterinarias; 2018.
- 32 Valladolid Cavero A. Aguaymanto. Biopat. 2015 Enero; 1(1).
- 33 Del Nobal B, Prado D, Escarcega A. BCulinaryLAB. [Online].; 2017 [cited 2020 Enero 18]. Available from: <http://www.bculinarylab.com/2017/05/30/equisetum-arvense-l-cola-de-caballo/>.
- 34 Ramos MJ. INKA PLUS. [Online].; 2016 [cited 2020 Enero 18. Available from: <https://www.inkaplus.com/media/web/pdf/Cola%20de%20Caballo.pdf>.
- 35 Campos Fernandez J. USO TERAPÉUTICO DE LA COLA DE CABALLO(*Equisetum arvense*) EN POBLADORES DE LA AMPLIACION VICTOR RAÚL HAYA DE LA TORRE. LA VICTORIA-CHICLAYO, SETIEMBRE 2014-AGOSTO 2015. TESIS. CHIMBOTE: UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES CHIMBOTE, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD; 2016.
- 36 Sorokin S. sistema estomatognatico. In Adriana b. Cavidad bucal, centro de variadas . funciones.: Medica Paramericana; 2015. p. 170-172.
- 37 Yener J. Guia de anatomia oral y dental. Silverti Medical Group. 2017 mayo; 3(1).
- 38 Sarduy Bermudez L, Gonzales Diaz ME. La biopelícula: una nueva concepción de la placa . dentobacteriana. Scielo. 2016 septiembre; 20(3).
- 39 Blanc V. Perio-expertise. [Online].; 2017 [cited 2020 enero 10. Available from: https://www.perioexpertise.es/sites/default/files/BIOFILMS_BUCALES_Dra_Vanessa_Blanc.pdf.
- 40 Vargas D. Unidad de prevención para la salud. [Online].; 2015 [cited 2020 enero 11. Available from: <https://www.anep.edu.uy/sites/default/files/images/Archivos/publicaciones/departamento-odontologico/caries.pdf>.
- 41 Hescot P. El desafío de las enfermedades bucodentales. Segunda edición ed. Benzian H, Willians D, Severin T, editors. Ginebra: Myriad Editions; 2015.
- 42 Martinez PP. Clinica Ferros & Bratos. [Online].; 2018 [cited 2020 enero 11. Available from: <https://www.clinicaferrusbratos.com/odontologia-general/tipos-de-caries/>.
- 43 CAQUI LAGUNA SN. EFECTO INHIBIDOR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DEL *Allium sativum* (AJO) A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN COMPARACIÓN AL PERIO-AID[®]

- FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus mutans*. tesis. Lima: UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER, Ciencias de la salud; 2016.
- 44 Loyola Rodas DA. Actividad antibacteriana de hojas de *Erythroxylum coca* Lam. (coca) y *Shinus molle* L. (molle), frente a *Streptococcus mutans* cepa ATCC 25175. Tesis. Lima: Universidad Nacional Federico Villareal, Facultad de odontología; 2019.
- 45 Cueva Rosales J. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro. Lima 2016. Tesis. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener, Facultad de ciencias de la salud; 2017.
- 46 Sanchez Loza J. Eficacia antibacteriana in vitro del extracto etanólico de Propoleo Versus el aceite esencial de *Origanum vulgare* (oregano) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Tacna, 2017. tesis. Tacna: Universidad Privada De Tacna, Facultad de ciencias de la Salud; 2017.
- 47 Carhuas Lastra RdP. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ORIGANUM VULGARE, MENTA PIPERITA, CYMBOPOGON CITRATUS SOBRE EL STREPTOCOCCUS MUTANS, LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN EL HOSPITAL MILITAR CENTRAL LIMA 2017. tesis. Huanuco: Universidad de Huanuco, Facultad de Ciencias de la salud; 2017.
- 48 Carroll C, Hobden JA, Miller S, Morse S. Microbiología médica. 27th ed. Blengio Pinto JR, Gonzales Loyola G, Barrera Villavicencio H, editors. Mexico: McGraw-Hill; 2016.
- 49 Silva M. Know.net. [Online].; 2018 [cited 2020 enero 14. Available from: know.net/es/ciencias-tierra-vida/biologia-es/crecimiento-bacterino/.
- 50 Garcia Rodriguez J, Canton R. Metodos basicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. In Picazo JJ, editor. procedimientos en microbiología clínica. Madrid; 2000.
- 51 Taroco R, Seija V. Temas de bacteriología y virología médica. In Vignoli R. Metodos de estudio de la sensibilidad antibiotica.; 2007. p. 663.
- 52 Ramirez LS, Marin Castaño D. Metodología para evaluar in-vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. 2009 agosto; 15(42): p. 263.
- 53 EcuRed. [Online].; 2017 [cited 2019 noviembre 11. Available from: http://ecured.cu/Colutorio_bucal.
- 54 Hernández C. Colutorios en Odontopediatría. [Online].; 2011 [cited 2019 septiembre 11. Available from: <https://gacetadental.com/2011/09/colutorios-en-odontopediatra-indicaciones-contraindicaciones-efectos-secundarios-criterios-de-seleccin-y-protocolo>.

- 55 Arredondo M. Clinicas dentales. [Online].; 2017 [cited 2019 septiembre 11. Available from: <https://www.sanitas.es/sanitas/seguros/es/particulares/biblioteca-de-salud/salud-dental/colutorios.html>.
- 56 Lozano C, Cordova D, Cordova M. Manual de tecnologia farmaceutica. Primera ed. S.A. F, . editor. Barcelona, España: El sevier ; 2012.
- 57 Aparicio D. Plus, Medline. [Online].; 2014 [cited 2019 julio 20. Available from: . www.medlineplus.sou/spanich/ency/article/001055.html.
- 58 Alonso Gonzales AC, Irache Garreia M, Locasa Arregui C, Frutos Cabanillas P. Tecnologia . Farmacéutica Formas Farmaceuticas. segunda ed. Vila Jato JL, editor. Madrid: Sintesis S.A.; 2001.
- 59 United S. Farmacopea de los Estados unidos de America (USP). 2017. Report No: USP 40- . NF35.
- 60 Camacho Huerta CH. Innovación de un método analítico para la cuantificación de taninos . en una formulación magistralpara un enjuague bucal de extracto de encino. tesis. Mexico D.F.: Universidad Autonoma de Mexico, Facultad de estudios superiores Aragoza; 2012.
- 61 Cedano Encarnacion MK. EFECTO DE LOS COLUTORIOS BUCALES LISTERINE FRESHBURST Y . COLGARE PLAX SOFT MINT SOBRE EL INDICE DE HIGENE ORAL EN PACIENTES ATENDIDOS EN EL SERVICIO DE PERIODONCIA DE LA CLINICA ULADECH CATOLICA TRUJILLO 2016. tesis. Trujillo: Universidad Catolica Los Angeles Chimbote, Facultad de ciencias de la salud; 2016.
- 62 Devices Beom. International Standar organizacion internacional de normalizacion (ISO . 10993-10)..
- 63 Vargas Miranda B, Ambriz Garcia D, Navarro Maldonado dC, Tejo Cordova A. Manejo de . animales el Bioterio de la UAM-1. primera edicion ed. Peñaloza Castro EA, editor. Mexico: IZTAPALAPA; 2018.
- 64 Bermudez A. Manera apropiada para recolectar y manejar las muestras para diagnostico. . Hy-line. 2017 marzo; III(23).
- 65 Montalvo Arenas CE. Tecnica Histologica. articulo de investigacion. Mexico Df.: . Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de medicina; 2010.
- 66 Verdin Teran SL, Moreno Fierros L, Rojo Botello NR, Garcia Hernandez AL, Omaña Molina . M. Histologia e Inmunohistoquimica. primera ed. Avila Valdivieso JJ, editor. Iztacala: DG Elihu Gamboa Mijangos; 2013.
- 67 Novak A. Tecnica Histologica. articulo. Buenos Aires: Universidad Nacional de San Juan, . Bioingenieria; 2013.

- 68 Vargas C. Collections M. ATCC bacterial products. [Online].; 2016 [cited 2019 septiembre 24]. Available from: www.atcc.org/en/Products/collections/microbiology_collections.aspx.
- 69 Pellaes C. Colgate. ¿que son las caries? [Online].; 2019 [cited 2019 Agosto 28]. Available from: <https://www.colgate.com/es-py/oral-health/conditions/cavities/what-are-cavities>.
- 70 Luna M. Salud, ABC. [Online].; 2014 [cited 2019 junio 20]. Available from: www.abc.es/salud/noticias/20141016/abc-coluntorio-salud-boca-201410160953.html.
- 71 Gavilanes Quizhpi , Aguirre Yela , Romero P. , Delgado Rodriguez. Determinación de la acción del azufre manoencapsulado en liposomas aplicado al cultivo in vitro del hongo Botrytis fabae. Ciencia. 2019 noviembre; 21(3).
- 72 Maita Alvarez JJ, Guerra Davila PJ. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In Vitro DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE Ruta graveolens (Ruda), MEDIANTE EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN FRENTE A Staphylococcus aureus y Escherichia coli. tesis. Iquitos: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2015.
- 73 Zagaceta Garcia JF. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE Chamaesyce thymifolia FRENTE A CEPAS BACTERIANAS POR LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN EN AGAR Y MACRODILUCIÓN. tesis. Iquitos: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2017.
- 74 SUAREZ MORENO V. Procedimiento par el uso de animales de laboratorio en el instituto nacional de salud, Comite de etica para animales de experimentación. resolución. Lima: Instituto Nacional de Salud, Oficina General de investigacion y transferencia tecnologica; 2012.
- 75 Melenchón Ramirez F, Collins Rosado B, Bravo del Moral AM. Manejo de animales de experimentacion. primera ed. Galicia Xd, editor. Santiago de Compostela: Conselleria do Medio Rural; 2018.
- 76 Gomez Del Pardo Rozas MdC, Aguilar Cruz CA. Histología animal. Manual de procedimientos. Mexico: Universidad Autonoma de Baja California Sur, Departamento academico de ciencias marías y costeras; 2011.
- 77 Herrera Acosta RJ, Fontalvo Herrera TJ. eumet.net. [Online].; 2017 [cited 2020 enero 14]. Available from: <http://www.eumed.net/libros-gratis/2011b/939/Prueba%20de%20Normalidad.htm>.
- 78 Cardenas L. Analisis de varianza anova. articulo. Mexico: Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de estudios superiores Cuautitlan; 2015.
- 79 Pascuzzo Lima A. Aldanálisis. [Online].; 2019 [cited 2020 enero 14]. Available from: <http://aldanalisis.blogspot.com/2019/04/test-de-duncan.html>.

- 80 Aparcana Ataurima M, Villareal Inca LE. Evaluación de la capacidad antioxidante de los . extractos etanolicos del fruto de *Physalis peruviana* "Aguaymanto" de diferentes lugares geográficos del Perú. Tesis. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y bioquímica; 2014.
- 81 Rossi D, Fuentes R, Pardo F, Reyes D, Tirado R, Urbina E, et al. Efecto de la temperatura y . sinergismo de sacarosa, sacarina y sugar light en la deshidratación osmótica de aguaymanto (*Physalis peruviana*). Tesis. Trujillo: Universidad nacional de Trujillo, Escuela de Ing. Agroindustrial; 2012.
- 82 Proaño Escudero JP. Comprobación del efecto cicatrizante de una crema a base de romero . (*Rosmarinus officinalis*), matico (*Piperaduncun*) y cola de caballo (*Equisetum arvense*) en heridas enducidas en ratones (*Mus musculus*). tesis. Rio Bamba Ecuador: Escuela superior Politecnica de Chimborazo, Facultad de ciencias; 2013.
- 83 Orozco Guanoluisa MA. Evaluación de la actividad cicatrizante de un gel elaborado a base . de los extractos de molle (*Schinus molle*), cola de caballo (*Equisetum arvense*), linasa (*Linun usitatissimu L.*) en ratones (*Mus musculus*). tesis. Riobamba Ecuador: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2013.
- 84 Medina Bernal. Determinación del efecto antimicrobiano in vitro del extracto de . *Equisetum L.* Cola de caballo sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Scherichia coli* y *Candida albicans*, Arequipa-2015. tesis. Arequipa: Universidad Catolica de Santa Maria, Facultad de Ciencias Farmaceuticas, Bioquimicas y Biotecnologicas ; 2016.
- 85 Lock O, Rojas R. Química y farmacología de *Physalis peruviana L.* (aguaymanto). Artículo . de investigación. Lima: Pontifica Universida catolica del Perú, Ciencias; 2005.
- 86 Bustamante Bustamante F. Desarrollo de una bebida funcional a base de extracto de . *Equisetum arvense* "cola de caballo" edulcorado con *Stevia rebaudiana vertoni* (estevia). tesis. Huacho: Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion, Ing. Agraria Industrias Alimentarias y Ambiental; 2015.
- 87 Leca Montañez HG. Norma sanitaria que establece los criterios microbiologicos de calidad . sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. El Peruano. 2008 Agosto: p. 1-23.
- 88 Valenzuela C. Perú 21. [Online].; 2019 [cited 2020 enero 9. Available from: . <https://peru21.pe/lima/ministerio-salud-minsa-90-4-peruanos-caries-dental-489121-noticia/>.
- 89 Uriol Plasencia E. Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos de . frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus Labill*) frente a *Staphylococcus aureus*. tesis. Trujillio: UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO, Facultad de medicina humana; 2019.

90 Sánchez Rojas MT. COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE CUATROS . COLUTORIOS BUCALES COMERCIALIZADS EN CHICLAYO SOBRE Streptococcus mutans ATCC 25175. TESIS. Pimentel: UNIVERSIDAD SEÑOR DE SIPÁN, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ; 2020.

ANEXOS


ANEXO N° 1

CERTIFICADO DE LA CEPA BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Streptococcus mutans</i> Catalog Number: 0268 Lot Number: 268-30** Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2021/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2019/6/15
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types, small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	Medium: SSAP
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cobs occurring singly, in pairs and predominantly 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 Quality Control Manager 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.

Note for Vittek®: Although the Vittek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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 logo are trademarks of ATCC, Microbiology, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



ANEXO N° 2

IDENTIFICACIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO POR EL HERBARIO VARGAS (CUSCO)



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL
N° 921 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222512
- RECTORADO
Calle Tigre 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: 227571 - 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
"Estado Universitario" - Teléfono: 227192

HERBARIO VARGAS CUZ

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 001-2021-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) -Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la señorita **Maybe Tatiana Quispe Gutiérrez**, con código de matrícula N° 110130, y el señor **Luis Jeffersson Mendoza Medina**, con código de matrícula N°122356, estudiantes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ) dos muestras botánicas para su determinación taxonómica (expediente N° 308334), para el proyecto de tesis intitulado "Formulación de un colutorio a base de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* "aguaymanto" y *Equisetum arvense* "cola de caballo", actividad in-vitro sobre *Sterptococcus mutans* y evaluación de la irritabilidad de la mucosa oral". La que al ser diagnosticada 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) y el sistema de clasificación vigente de las Pteridophytas.

N°	Familia	Especie	Nombre Local
1	Solanaceae	<i>Physalis peruviana</i> L.	"aguaymanto"
2	Equisetaceae	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth	"cola de caballo"

Se le expide la presente certificación a petición formal de los interesados para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 16 de Febrero del 2021

Blg. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas CUZ



ANEXO N° 3

CONSTANCIA DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL COLUTORIO ELABORADO CON LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* "AGUAYMANTO" Y *Equisetum bogotense kunth* "COLA DE CABALLO"

Laboratorio Louis Pasteur S.R.Ltda.
Urb. Velasco Astete D-18-B
Wanchaq - Cusco - Perú
Telefax: 084-234727
Celular: 975 713500 - 974787151
laboratoriouloupasteur@yahoo.es
www.labloupasteur.pe

INFORME DE ENSAYO
LLP-1756-2020
SO-0691-2020


LABORATORIO LOUIS PASTEUR

Pág. 1 de 1

INFORMACIÓN DEL CLIENTE
Solicitante: Mayra Quispe Gutiérrez / Luis Mendoza Medina
Dirección Legal: APV Capac Yupanqui E-12, Wanchaq

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA
Nombre del Producto: Colutorio a base de extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* y *Equisetum bogotense*
Fecha de Ingreso de Muestra: 2020/09/18
Fecha de Ensayo: 2020/09/18

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA Y REPORTE DE RESULTADOS
Toma de muestra realizada por: Srta. Mayra Quispe Gutiérrez.
Fecha de Toma de Muestra: 2020/09/18
Procedencia de la Muestra: Laboratorio del Área Farmacéutica – Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.
Cantidad y Descripción de la Muestra: 02 frascos de polietileno de 200ml c/u.
Fecha de Emisión de Informe de Ensayo: 2020/09/23

Datos declarados por el cliente
Referencia: Los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Ensayo(s)	Unidad	Resultado(s)
Numeración de aerobios mesófilos Recuento estándar en placa estimado	ufc/ml	<10
Numeración de Coliformes	NMP/ml	<3
Numeración de <i>Escherichia coli</i>	NMP/ml	<3
Numeración de Mohos Recuento estándar en placa estimado	ufc/ml	<10
Numeración de Levaduras Recuento estándar en placa estimado	ufc/ml	<10
Detección de Salmonella en 25 ml	-	Ausente

Métodos de Referencia:
Numeración de Microorganismos Aerobios Mesófilos: ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su Significado y Métodos de enumeración. Método 1, Pág. 120-124 2da Ed. Vol. 1, Parte II Reimpresión 2000 (1983)
Recuento de Coliformes (NMP): ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su significado y Métodos de enumeración. Método 1, Pág. 130-134 2da Ed. Vol. 1, Parte II Reimpresión 2000 (1983)
Numeración de *Escherichia coli*: ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su Significado y Métodos de enumeración. Pág. 132-134 138, 139-142 2da Ed. Vol. 1, Reimpresión 2000 (1983)
Recuento de Mohos y Levaduras: ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su significado y métodos de enumeración. Pág. 166-167 2da Ed. Vol. 1, Parte II, Reimpresión 2000 (1983)
Detección de Salmonella: ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su Significado y Métodos de enumeración. Pág. 172-175 2da Ed. Vol. 1, Parte II, Reimpresión 2000 (1983)


Blga. Mercedes Maritza Quispe Flores
C. D. E. 4217



NOTA: Los resultados de los ensayos deben ser utilizados como una certificación de conformidad de producto o una certificación del Sistema de Calidad de la entidad que lo produce. Este documento no podrá ser reproducido parcialmente sin la autorización del Laboratorio Louis Pasteur S.R.Ltda. Los resultados solo se refieren a los ítems ensayados. El presente informe de ensayo se refiere únicamente a la muestra analizada.

ANEXO N° 4

CONSTANCIA DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE *Physalis peruviana* “AGUAYMANTO” Y *Equisetum bogotense kunth* “COLA DE CABALLO”

Laboratorio Louis Pasteur S.R.Ltda.

Urb. Velasco Astete D-18-B
Wanchaq - Cusco - Perú
Telefax: 084-234727
Celular: 975 713500 - 974787151
laboratoriolouispasteur@yahoo.es
www.lablouispasteur.pe

INFORME DE ENSAYO
LLP-1757-2020
SO-0691-2020



Pág. 1 de 1

INFORMACIÓN DEL CLIENTE

Solicitante: Maybe Quispe Gutierrez / Luis Mendoza Medina

Dirección Legal: APV Capac Yupanqui E-12, Wanchaq

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Nombre del Producto: Extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* y *Equisetum arvense*

Fecha de Ingreso de Muestra: 2020/09/18

Fecha de Ensayo: 2020/09/18

INFORMACIÓN DE LA MUESTRA Y REPORTE DE RESULTADOS

Toma de muestra realizada por: Srta. Maybe Quispe Gutierrez

Fecha de Toma de Muestra: 2020/09/18

Procedencia de la Muestra: Laboratorio del Área Farmacéutica – Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco.

Cantidad y Descripción de la Muestra: 02 frascos de polietileno de 200ml c/u.

Fecha de Emisión de Informe de Ensayo: 2020/09/23

Datos declarados por el cliente

Referencia: Los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió

RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

Ensayo(s)	Unidad	<i>Physalis peruviana</i>	<i>Equisetum arvense</i>
Numeración de aerobios mesófilos Recuento estándar en placa estimado	-	Ausente	Ausente
Numeración de Coliformes	-	Ausente	Ausente
Numeración de <i>Escherichia coli</i>	-	Ausente	Ausente
Numeración de Mohos Recuento estándar en placa estimado	-	Ausente	Ausente
Numeración de Levaduras Recuento estándar en placa estimado	-	Ausente	Ausente
Detección de <i>Salmonella</i> en 25 ml	-	Ausente	Ausente

Métodos de Referencia:

Numeración de Microorganismos Aerobios Mesófilos

ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su Significado y Métodos de enumeración. Método 1, Pág. 120-124 2da Ed. Vol. 1, Parte II Reimpresión 2000 (1983)

Recuento de Coliformes (RMP)

ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su significado y Métodos de enumeración. Método 1, Pág. 132-134 2da Ed. Vol. 1, Parte II Reimpresión 2000 (1983)

Numeración de *Escherichia coli*

ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su Significado y Métodos de enumeración. Pág. 133-134 120, 130-140 2da Ed. Vol. 1, Reimpresión 2000 (1983)

Recuento de Mohos y Levaduras

ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su significado y métodos de enumeración. Pág. 105-107 2da Ed. Vol. 1, Parte II, Reimpresión 2000 (1983)

Detección de *Salmonella*

ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su Significado y Métodos de enumeración. Pág. 172-178 2da Ed. Vol. 1, Parte II, Reimpresión 2000 (1983)

Btga. Mercedes Maritza Quispe Flores



Los resultados de los ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad de producto o una certificación del Sistema de Calidad de la entidad que lo produce. Este documento no podrá ser reproducido parcialmente sin la autorización del Laboratorio Louis Pasteur S.R.Ltda. Los resultados solo se refieren a los ítems ensayados. El presente informe de ensayo se refiere únicamente a la muestra analizada.

ANEXO N° 5

CERTIFICADO DE SALUD DE LOS ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN

COLLEGIO MEDICO VETERINARIO DEL PERU
Pedro Trigueros N° 208 - Santa Rita
Lima - Perú

N° 287736

**CMVD
CUZCO**

CERTIFICADO DE SALUD

El Médico Veterinario que suscribe **CERTIFICA**, haber examinado clínicamente al animal que a continuación se describe:

Especie *hámster sirio* Raza *siamesa* Sexo *♀* Edad *1 mes*
Nombre *.....* Señas particulares (color, tinte, etc) *sanamente*
Habiéndose comprobado que para el momento del examen, el animal en mención se encuentra libre de enfermedades infecto-contagiosas y parasitarias transmisibles a hombres y a otros.
Se expide el presente a solicitud de *Juan Mendoza Medina y Narda Cueva Gutierrez*
Domiciliado en *ciudad. maribato. Peruya* para los fines que crea conveniente.
En *Cuzco* a los *30* de *Julio* del *2020*
Observaciones *no se han observado a la misma cepa conserguencia.*

Carlos Valdez Palomino
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNO
C.M.V.P. 10509

Carlos Valdez Palomino
Nombre y Apellidos, Domicilio y N° C.M.V.P. del
Médico Veterinario responsable.

Médico Veterinario
Lima

Nota: Este Certificado tiene una validez de 16 días

ANEXO N° 6

FICHA DE RECOLECCION DEL ANALISIS HISTOPATOLOGICOS DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

RESULTADO DE ANALISIS HISTOPATOLOGICO DE MUESTRAS DE MUCOSA ORAL

Codigo de laminas	6	7	8	3	4	5	1	2
	ojos rojos	chasc oso	chinito	blanco	beis	gring o	beis	blanco
	G1			G2			G3	
	1	2	3	1	2	3	1	2

CAMBIOS EN EPITELIO

NORMAL	X	X	X	X	X	X	X	X
Degeneracion								
Metaplasia								
erosion focal								
erosion generalizada								

INFILTRADO DE LEUCOCITOS (por campo de alto poder)

Ausente	X	X	X	X	X	X	X	X
Minimo (menos de 25)								
Leve (26 a 50)								
moderado (51 - 100)								
marcado (mayor que 100)								

CONGESTION VASCULAR

Ausente		x	x	X				X
Minimo	x				X	X	X	
Leve								
moderado								
Marcado con rotura de vasos								

EDEMA

Ausente			X	X			X	X
Minimo	X	X			X	X		
Leve								
moderado								
Marcado								

LEYENDA

G1: Colutorio elaborado a base de Physalis peruviana y Equisetum arvense

G2: Colutorio listerine

G3: Control



 INSTITUTO DE DIAGNÓSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLÓGICA
 MINISTERIO DE SALUD
 LIMA

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO N° 8

FICHA DE RECOLECCION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

ESPECIE	PESO DE MUESTRA FRESCA	PESO DE MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO % DE HUMEDAD
<i>Aguaymanto Physalis peruviana</i>				

Fuente: Elaboración propia.

ESPECIE	PESO DE MUESTRA FRESCA	PESO DE MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO % DE HUMEDAD
<i>Cola de caballo Equisetum bogotense kunth</i>				

Fuente: Elaboración propia.

ANEXO N° 9

FICHA DE RECOLECCION DE SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

SOLVENTE	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	
	<i>Physalis peruviana / Equisetum bogotense kunth</i>	
	Frio	Caliente
AGUA DESTILADA		
ETANOL 40°		
ETANOL 70°		
ETANOL 96°		
ACETONA		
ACETATO DE ETILO		
CLOROFORMO		
ETER ETILICO		
TWEEN 80		
BENCINA		

Fuente: Elaboración propia.

Leyenda:

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

ANEXO N° 10

FICHA DE RECOLECCION DE LA MARCHA FITOQUIMICA DE
LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS

	EXTRACTO HIDROALCOHOLICO	
METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	Physalis peruviana / <i>Equisetum bogotense kunth</i>
FLAVONOIDES	Shinoda	
	Vapores de NH ₃	
FENOLICOS	FeCl ₃	
QUINONAS	Börntrager	
TANINOS	FeCl ₃ 1%	
AZUCARES REDUCTORES	Fheling	
GLICOSIDOS	Fheling	
ALCALOIDES	Dragendorff	
SAPONINAS	Prueba de espuma	
LACTONAS SESQUITERPENICAS	Balget	
ESTEROIDES	Lieberman-Burchard	

LEYENDA:

Muy abundante : +++
 Abundante : ++
 Poco abundante : +
 Negativo : -

ANEXO N° 11

FICHA DE RECOLECCION DE CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS Y FISICOQUIMICAS DEL
EXTRACTO HIDROALCOHOLICO

		EXTRACTO HIDROALCOHOLICO
ORGANOLEPTICAS	COLOR	
	OLOR	
	SABOR	
	APARIENCIA	
FISICOQUIMICAS	DENSIDAD	
	Ph	

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 12

FICHA DE RECOLECCION DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

<i>ESPECIE</i>	<i>TIEMPO (horas)</i>	<i>ABSORVANCIA (Abs)</i>
<i>STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175</i>	<i>0</i>	
	<i>2</i>	
	<i>4</i>	
	<i>6</i>	
	<i>8</i>	
	<i>10</i>	
	<i>12</i>	
	<i>24</i>	

Fuente: elaboración propia

ANEXO N° 13

FICHA DE RECOLECCION DE HALOS DE INHIBICION DE LA SENSIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* FRENTE A LOS EXTRACTOS HIDROALCOHOLICOS

FECHA:...../...../.....					HORA:...../...../.....				
HALOS DE INHIBICION (mm) DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC									
N°	CONCENTRACION DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO EN (mg/ 500uL)	Extracto hidroalcohólico seco de <i>Physalis peruviana</i>				Extracto hidroalcohólico seco de <i>Equisetum bogotense kunth</i>			
		I (mm)	II (mm)	III (mm)	PROMEDIO (mm)	I (mm)	II (mm)	III (mm)	PROMEDIO (mm)
1	5								
2	15								
3	25								
4	75								
5	125								
11	Control								

Fuente: Moína Gallegos Víctor

Leyenda: I, II, III = número de pruebas

ANEXO N° 14

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO SEGÚN LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA

FECHA:...../...../.....

HORA:...../...../.....

CONCENTRACION MINIMA DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO AGUAYMANTO y COLA DE CABALLO
FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC

N°	CONCENTRACION DE PRINCIPIO ACTIVO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO SECO DILUIDO	CLASIFICACIÓN				
		SIN TURBIDEZ (0)	POCO ACTIVO (1)	BUENA ACTIVIDAD (2)	MODERADA ACTIVO (3)	INACTIVO (4)
1	32 mg/MI					
2	16 mg/MI					
3	8 mg/MI					
4	4 mg/MI					
5	2 mg/MI					
6	1 mg/MI					
7	0.5 mg/MI					
8	0.25 mg/ MI					

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 15

FICHA DE RECOLECCION DE HALOS DE INHIBICION DEL COLUTORIO
ELABORADO

N°	COLUTORIOS	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO	DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (MM)			PROMEDIO
			Dato 1	Dato 2	Dato 3	
COLUTORIO ELABORADO						
1	Sin principio activo	0 mg				
2	Con extracto hidroalcohólico seco de:	16 mg				
	<ul style="list-style-type: none"> ➤ <i>Physalis peruviana</i> ➤ <i>Equisetum bogotense kunth</i> 	32 mg				
ENJUGUE COMERCIAL						
3	Listerine					

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 16

FICHA DE RECOLECCION DE CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS Y FISICOQUIMICAS DEL COLUTORIO ELABORADO

		COLUTORIO ELABORADO
ORGANOLEPTICAS	COLOR	
	OLOR	
	SABOR	
	APARIENCIA	
FISICOQUIMICAS	DENSIDAD	
	Ph	
MICROBIOLÓGICAS	Aerobios Totales	
	Conformes Totales	
	Mohos y Levaduras	

Fuente: Elaboración propia

ANEXO N° 17

FICHA DE RECOLECCION DE CARACTERÍSTICAS DE LA IRRITABILIDAD EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

REACCIÓN	CALIFICACIÓN NUMERICA								
	G1			G2			G3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Formación de eritemas y escaras									
Sin eritema									
Muy leve eritema (apenas perceptible)									
Eritema bien definido									
Eritema moderado									
Eritema severo (enrojecimiento de la remolacha) a la formación de escaras evitando la clasificación del eritema									
Otros cambios adversos de los tejidos deben ser registrados e informados									
➤									
➤									
➤									
➤									
➤									
➤									
➤									

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- ❖ G1 colutorio elaborado a base de *Physalis peruviana* y *Equisetum bogotense kunth*
- ❖ G2 colutorio listerine
- ❖ G3 control

ANEXO N° 18

FICHA DE RECOLECCION PARA EL ANALISIS HISTOPATOLOGICO DE LA MUCOSA BUCO-ORAL EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

REACCIÓN	CALIFICACIÓN NUMERICA								
	G1			G2			G3		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Epitelio									
Normal, intacto									
Degeneración celular o aplanamiento									
Metaplasia									
Erosion focal									
Erosion generalizada									
Infiltración de leucocitos (por campo de alta potencia)									
Ausente									
Mínimo (menos de 25)									
Leve (26-50)									
Moderado (51-100)									
Marcado (mayor que 100)									
Congestión vascular									
Ausente									
Mínimo									
Leve									
Moderado									
Marcado con rotura de vasos									
Edema									
Ausente									
Minimo									
Leve									
Moderado									
Marcado									

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- ❖ G1 colutorio elaborado a base de *Physalis peruviana* y *Equisetum bogotense kunth*
- ❖ G2 colutorio listerine
- ❖ G3 control

ANEXO N° 19

AGAR SANGRE

USO

- Medio de cultivo utilizado para el aislamiento de numerosos microorganismos al ser suplementado con sangre ovina, permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis.

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 (Britasheep) promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.
- Contenido y Composición Código B0214905: envase x 100 g. Código B0214906: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

- Infusión de Músculo de Corazón: 375.0
- Peptona: 10.0
- Cloruro 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:

- Agregar 5-10 % de sangre ovina desfibrinada estéril (Britasheep) al medio esterilizado, fundido y enfriado a 45-50 °C. Homogeneizar y distribuir en placas de Petri estériles.

INCUBACIÓN

- El tiempo, temperatura y atmósfera de incubación, dependerán del microorganismo que se quiera recuperar.
- en general se recomienda:
- Bacterias de fácil crecimiento: en aerobiosis, a 35-37 °C hasta 48 horas.
- Bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales: en atmósfera con 5 % de Co₂, a 35-37 °C durante 24-48 horas.

Fuente: britanialab.com

ANEXO N° 20

INFORMACIÓN CALDO MULLER HINTON

USO

- Medio universalmente recomendado para realizar la prueba de sensibilidad de los antimicrobianos en medio líquido.

FUNDAMENTO

- Medio nutritivo que favorece el crecimiento de diversos microorganismos. Se utiliza para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los microorganismos frente a los antimicrobianos.
- Al igual que su presentación en forma de agar, el caldo Mueller Hinton presenta buena reproducibilidad de los resultados lote a lote y tiene un bajo contenido de inhibidores especialmente para sulfamidas, trimetoprima y tetraciclinas.
- Puede ser suplementado para permitir el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales.
- Con el agregado de sangre se evalúan ciertas especies de Streptococcus y con el agregado de determinados cationes se evalúa el crecimiento de Pseudomonas frente a aminoglucósidos.

FÓRMULA (en gramos por litro)

- 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.

PROCEDIMIENTO

- Siembra
 - Preparar el inóculo del microorganismo en estudio equivalente al Standard 0,5 de Mc Farland mediante crecimiento en medio líquido o suspensión directa de la colonia. En estas condiciones el inóculo microbiano es $1-2 \times 10^8$ UFC/ml
 - Dentro de los 15 minutos que el inóculo ha sido estandarizado inocular el caldo Mueller Hinton con un volumen determinado para que cada tubo contenga 5×10^5 UFC/ml (rango 3×10^5 a 7×10^5 UFC/ml).

INCUBACIÓN

- Consultar en bibliografía de referencia la metodología apropiada según el microorganismo en estudio.

Fuente: britanialab.com

ANEXO N° 21

INFORMACIÓN 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 N° 22

PROCEDIMIENTO PARA LA ACTIVACION DE LA CEPA DE *Streptococcus mutans*

INSTRUCCIONES ILUSTRADAS

Las preparaciones de microorganismos KWIK-STIK™ y KWIK-STIK™ Plus contienen un sedimento liofilizado de una única cepa de microorganismos.

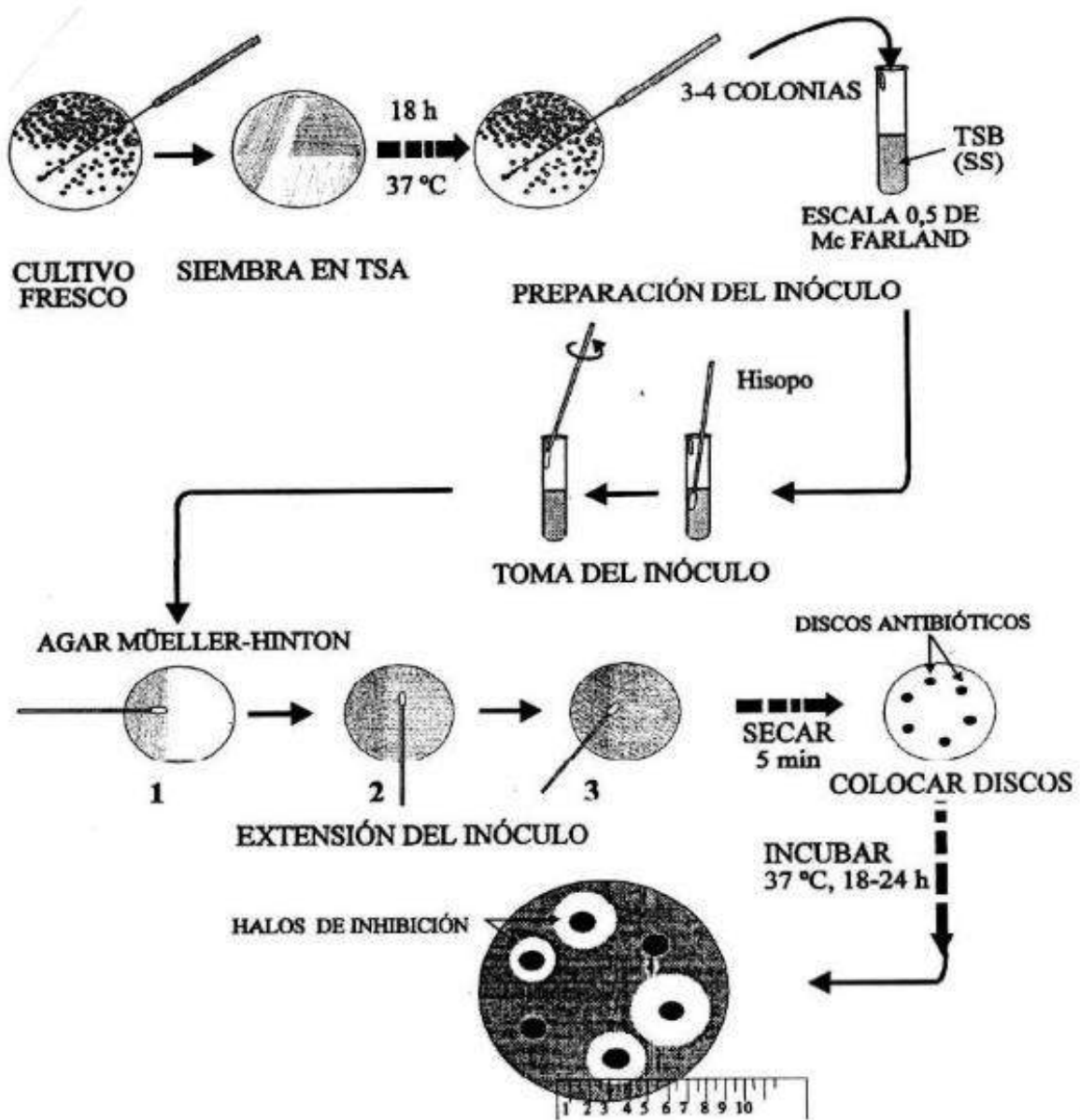


 **Microbiologics®**

A safer, healthier world.

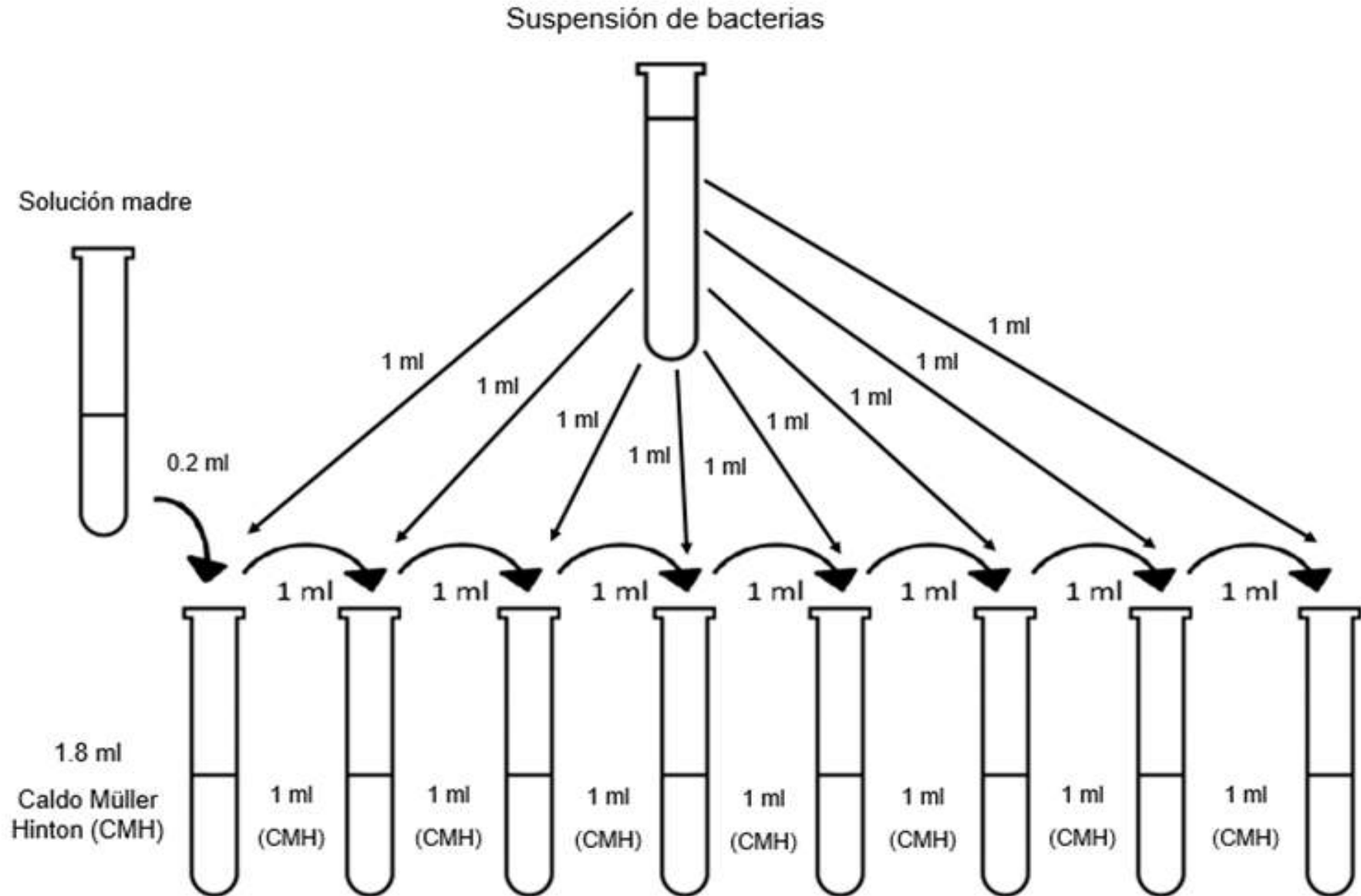
ANEXO N° 23

PROCEDIMIENTO PARA DESARROLLAR METODO DE KIRBY BAUER



ANEXO N° 24

PROCEDIMIENTO PARA DESARROLLAR METODO DE MACRODILUCIÓN



ANEXO N° 21

ARCHIVO FOTOGRAFICO

Fotografía N° 1



Fotografía N° 5



Fotografías N° 1 y 2: Recolección de las especies vegetales, aguaymanto en el distrito de Pillpinto comunidad de Mayuhuilca y cola de caballo en la provincia y distrito de Acomayo sector Simpi.



Fotografías 3 y 4: Secado de las especies vegetales cola de caballo y aguaymanto

Fotografía N° 9

Fotografía N° 13



Fotografía N° 17



Fotografía N° 21



Fotografías N° 5 y 6: Proceso de molienda de las especies vegetales.

Fotografía N°



Fotografía N° 7: Macerado de las especies vegetales molidas con alcohol al 70%.

Fotografía N° 29

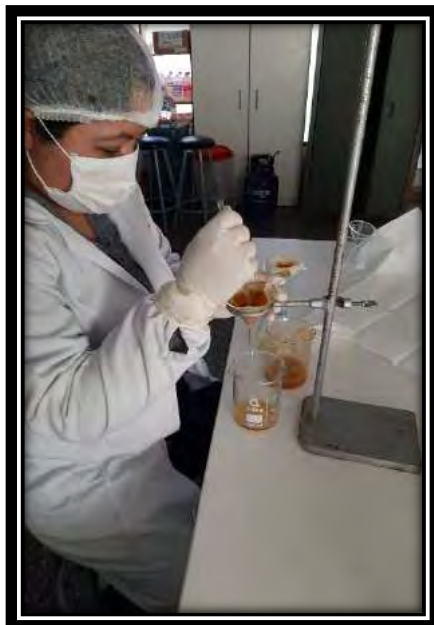


Fotografía N° 33



Fotografías N° 8 y 9: Pesaje de las especies vegetales para la determinación del porcentaje de humedad.

Fotografía N° 37

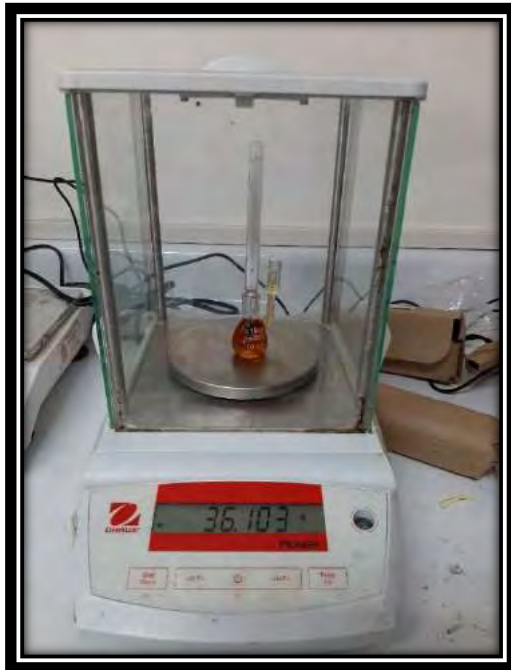


Fotografía N° 41

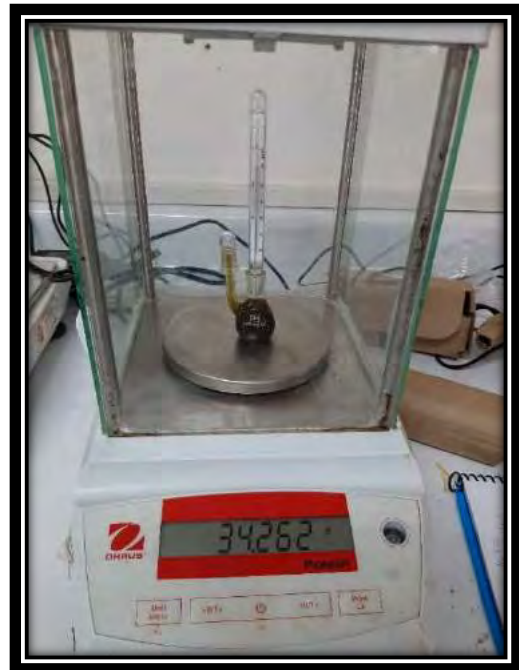


Fotografías N° 10 y 11: Filtrado posterior al proceso de maceración.

Fotografía N° 45



Fotografía N° 49



Fotografías N° 12 y 13: Determinación de la densidad del extracto hidroalcohólico de aguaymanto y del extracto hidroalcohólico de cola de caballo.

Fotografía N° 57



Fotografía N° 53



Fotografías N° 14 y 15: Determinación del pH de cada extracto hidroalcohólico

Fotografía N° 656



Fotografía N° 617



Fotografías N° 16 y 17: Evaporación del filtrado de los extractos hidroalcohólicos teniendo en cuenta, que la temperatura no sobrepase los 45 °C.

Fotografía N° 698

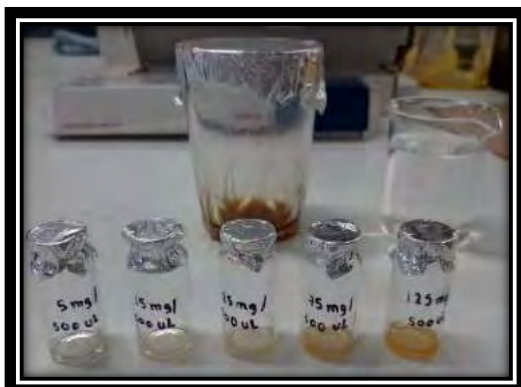


Fotografía N° 739

Fotografías N° 18 y 19: Pruebas de solubilidad de los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto y cola de caballo.



Fotografía N° 20



Fotografía N° 21

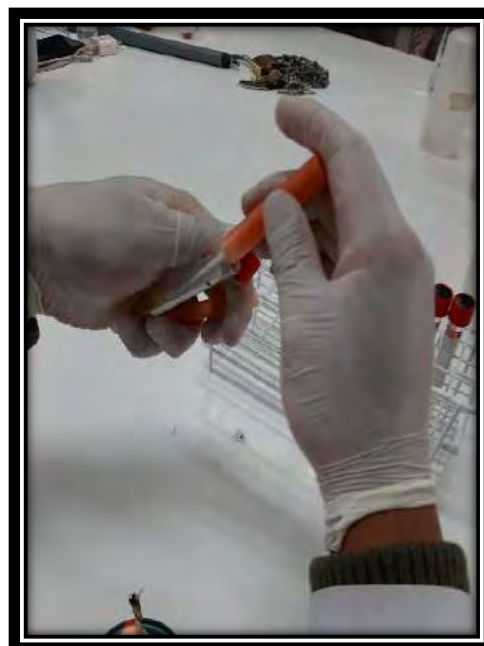


Fotografías N° 20 y 21: Se realizó la prueba de sensibilidad bacteriana mediante el método de Kirby Bauer, por lo cual se procedió a separar en viales debidamente rotulados, los extractos hidroalcohólicos secos respectivamente, en las concentraciones requeridas para la determinación

Fotografía N° 22

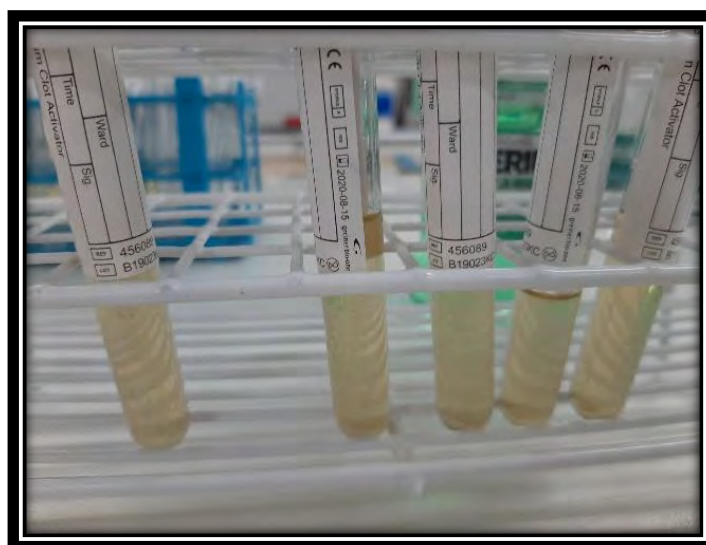


Fotografía N° 23



Fotografías N° 22 y 23: Activación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Fotografía N° 24



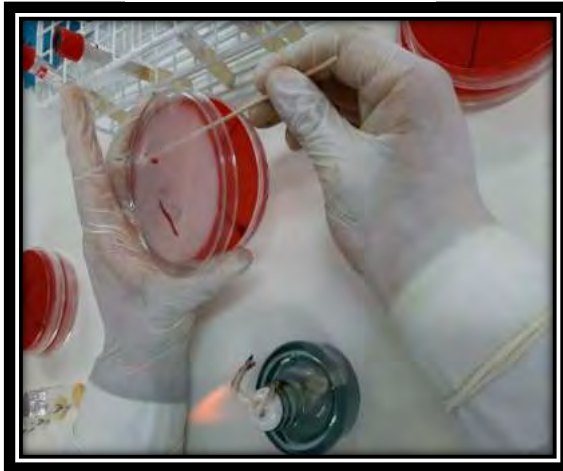
Fotografía N° 24: Caldo BHI medio energético, para el desarrollo de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Fotografía N° 25



Fotografías N° 25: Incubación de la cepa activada, por 24 horas a una temperatura entre 36 a 37.5 °C.

Fotografía N° 26



Fotografía N° 27



Fotografías N° 26 y 27: Sembrado de la cepa activa en las placas de agar sangre.

Fotografía N° 28

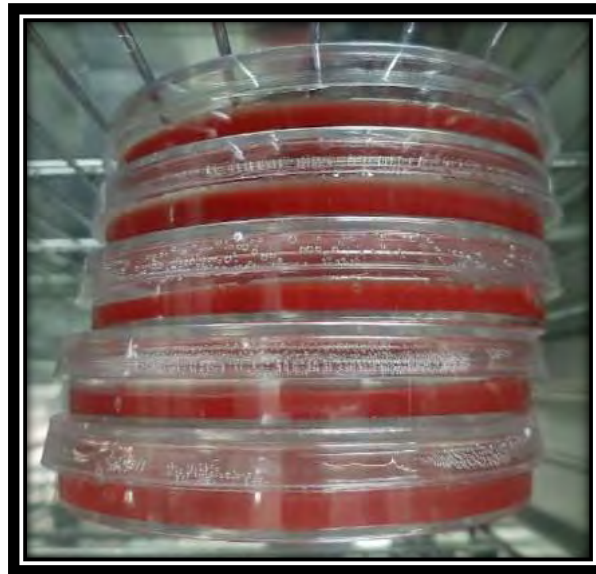


Fotografía N° 29



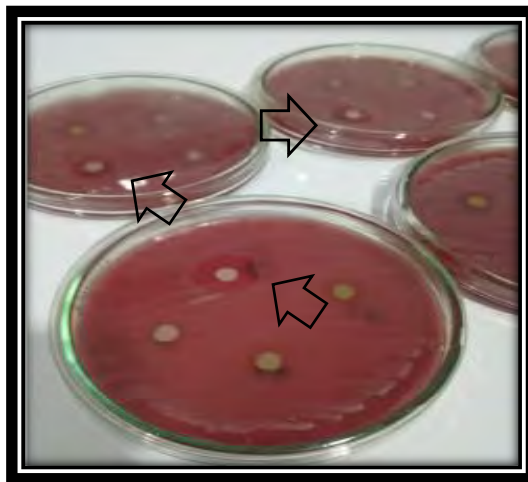
Fotografías N° 28 y 29: Colocación de los discos, para la determinación de la sensibilidad bacteriana.

Fotografía N° 30



Fotografía N° 30: Incubación por 24 horas de las placas de agar sangre con los discos.

Fotografía N° 31



75 mg / 500 uL

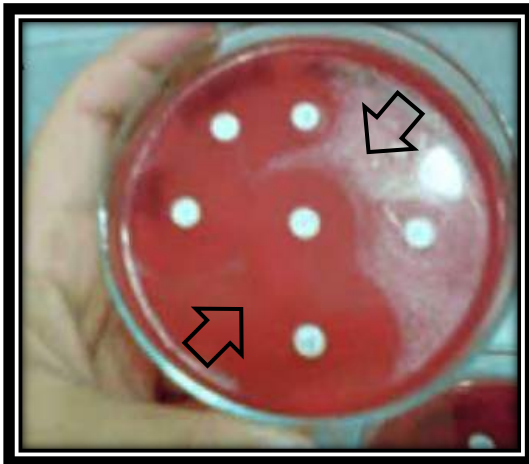
Fotografía N° 32



125 mg / 500 uL

Fotografías N° 31 y 32: Halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana del extracto de aguaymanto.

Fotografía N° 33



75 mg / 500 uL

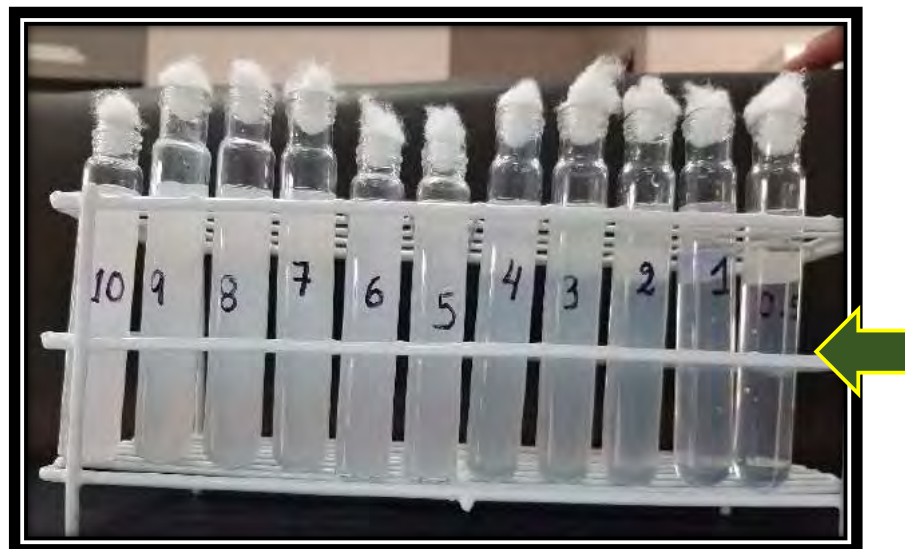
Fotografía N° 34



125 mg / 500 uL

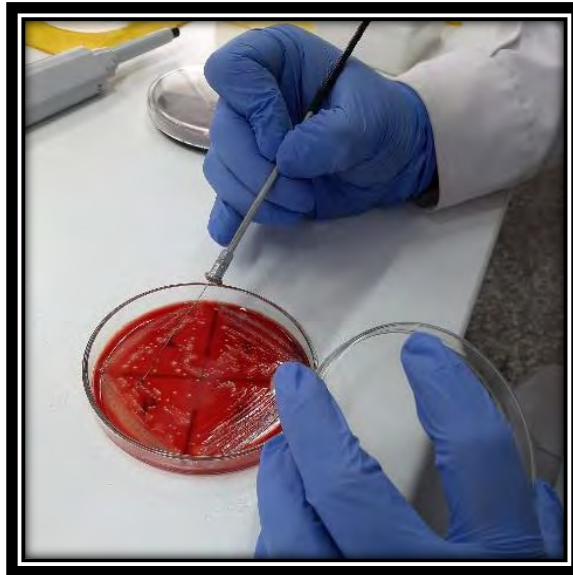
Fotografías N° 33 y 34: Halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana del extracto de cola de caballo.

Fotografía N° 35



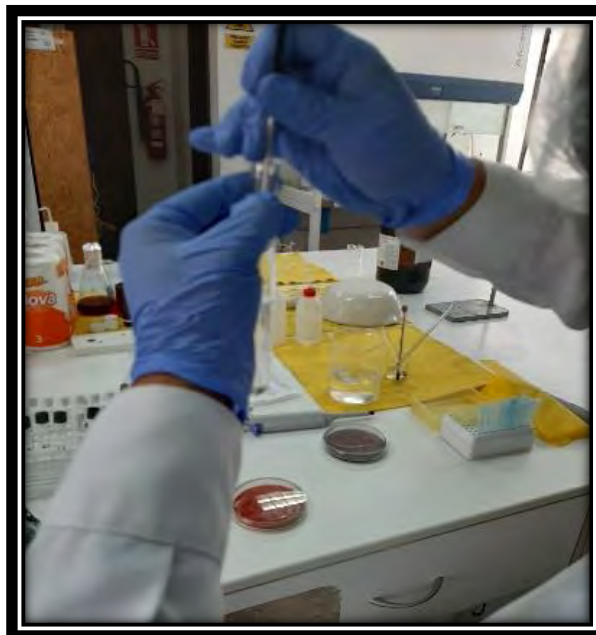
Fotografía N° 35: Preparación de la escala de McFarland que se utiliza para la comparación del número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC que se encuentra en suspensión que va en una escala de 0.5 a 10.

Fotografía N° 36



Fotografía N° 36: Preparación del inculo, en la cual con un asa estéril se procedió a tomar entre 3 a 5 colonias de la cepa de *Streptococcus mutans*.

Fotografía N° 37



Fotografía N° 37: Suspensión bacteriana, una vez teniendo las cepas se procedió a sumergir solución fisiológica hasta lograr el grado de turbidez requerida mediante la escala de McFarland de 0.5 que equivale aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL

Fotografía N° 38



Fotografía N° 38: Comparación de los tubos para ver las suspensiones bacterianas.

Fotografía N° 39



Tubo con
solución madre
del extracto de
aquaymanto

Tubo con
solución madre
del extracto de
cola de caballo

Fotografía N° 39: Tubos con solución madre para la prueba de CMI mediante el método de macrodilución o diluciones seriadas.

Fotografía N° 40



Fotografía N° 41



Fotografías N° 40 y 41: Desarrolló de la técnica de macrodilución o diluciones seriadas, partiendo de una solución madre de cola de caballo y de aguaymanto.

Fotografía N° 42



CMI

Fotografía N° 42: Tubos posteriores al proceso de incubación para la determinación de la CMI de aguaymanto

Fotografía N° 43



CMI

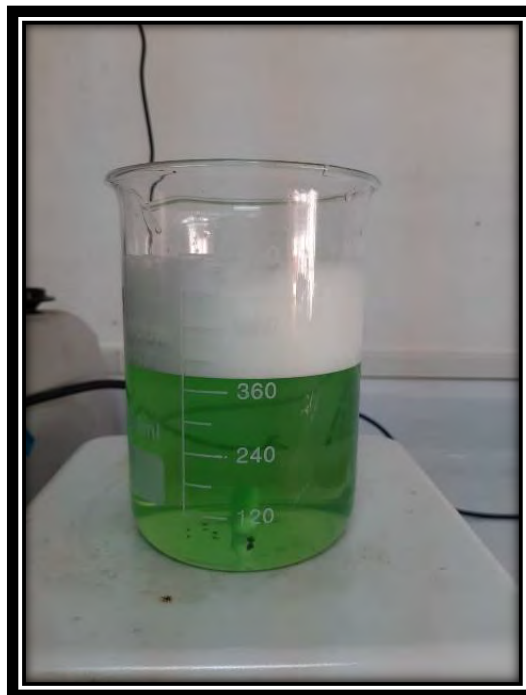
Fotografía N° 43: Tubos posteriores al proceso de incubación para la determinación de la CMI de cola de caballo.

Fotografía N° 44



Fotografía N° 44: Se elaboró 4 pre formulaciones del colutorio para luego obtener una quinta formulación que es nuestra formulación final.

Fotografía N° 45

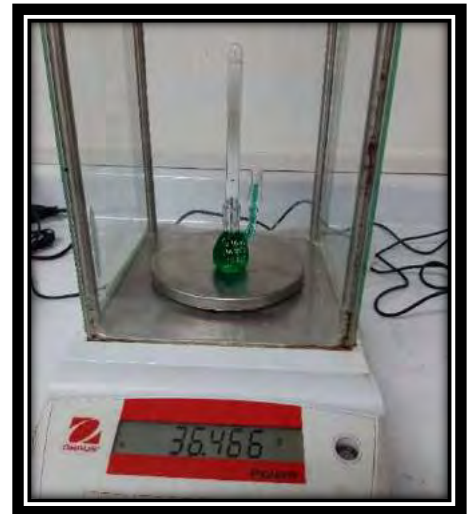


Fotografía N° 45: Colutorio elaborado a base de los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto y cola de caballo, teniendo como punto de partida la CMI obtenida de la técnica de macrodilución.

Fotografía N° 46

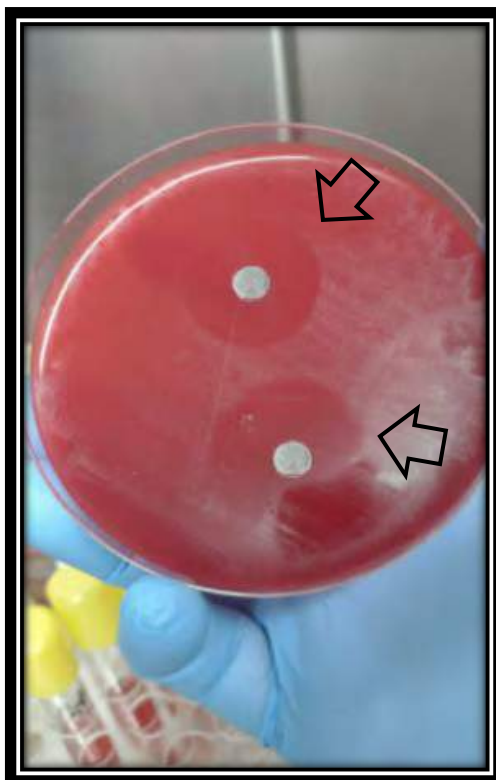


Fotografía N° 47



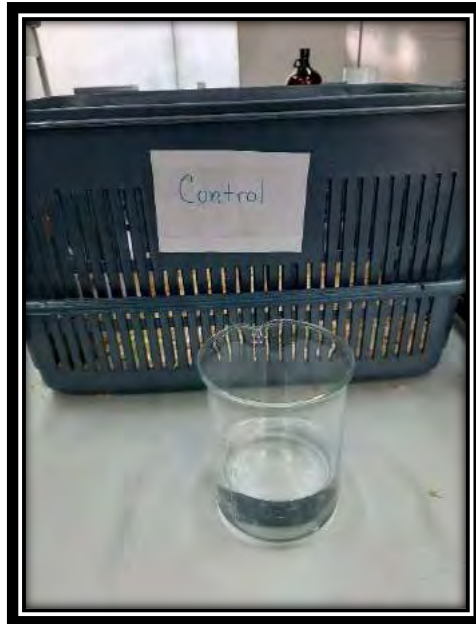
En las fotografías N° 46 y 47: Se muestran las pruebas de determinación fisicoquímica del colutorio elaborado

Fotografía N° 48



En la fotografía N° 48: Se muestran los halos de inhibición de la sensibilidad bacteriana del colutorio elaborado.

Fotografía N° 49



Fotografía N° 50



Fotografía N° 51



En las fotografías N° 49, 50 y 51: Se muestran. 3 cajas en las cuales se separó a los animales de experimentación, en la caja 1 el grupo control (agua destilada), caja 2 grupo listerine y la caja numero 3 (colutorio elaborado a base de aguaymanto y cola de caballo

Fotografía N° 52

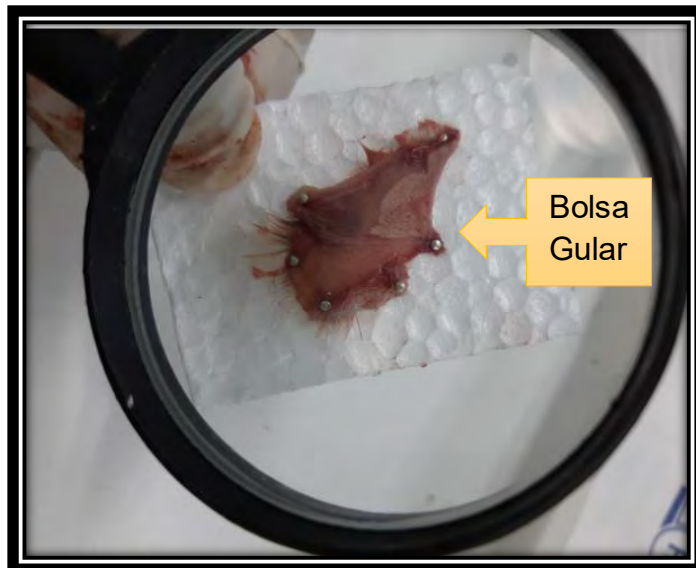


Fotografía N° 53



Fotografías N° 52 y 53: Hisopos previamente remojados en las diferentes soluciones para determinar la irritación de estos.

Fotografía N° 54

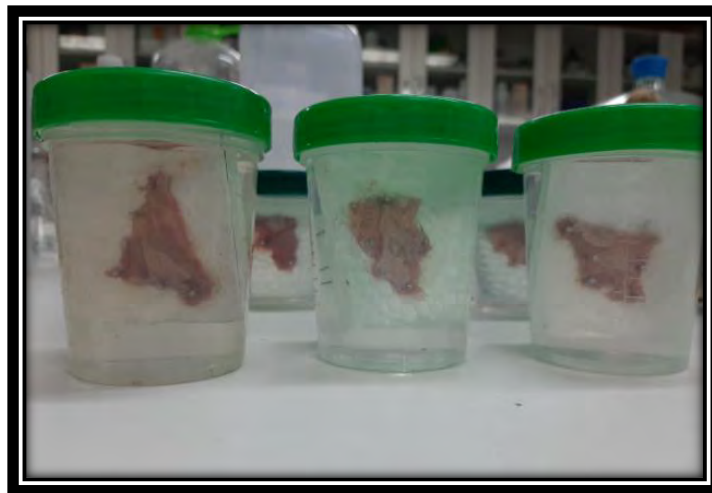


Fotografías N° 54: Se muestra la bolsa gular de los animales de experimentación.

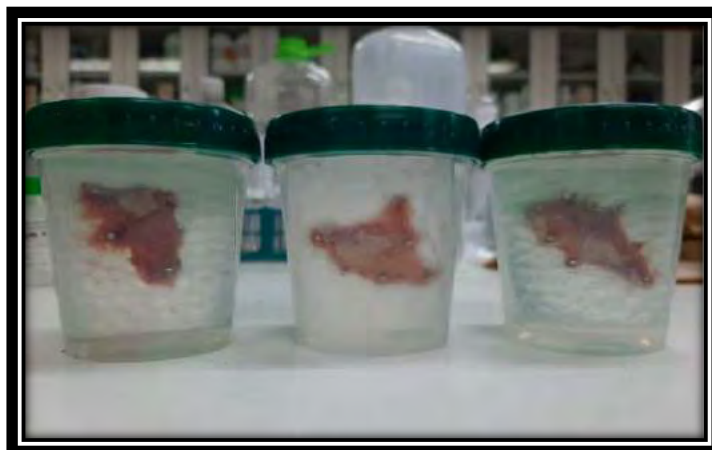
Fotografía N° 55



Fotografía N° 56

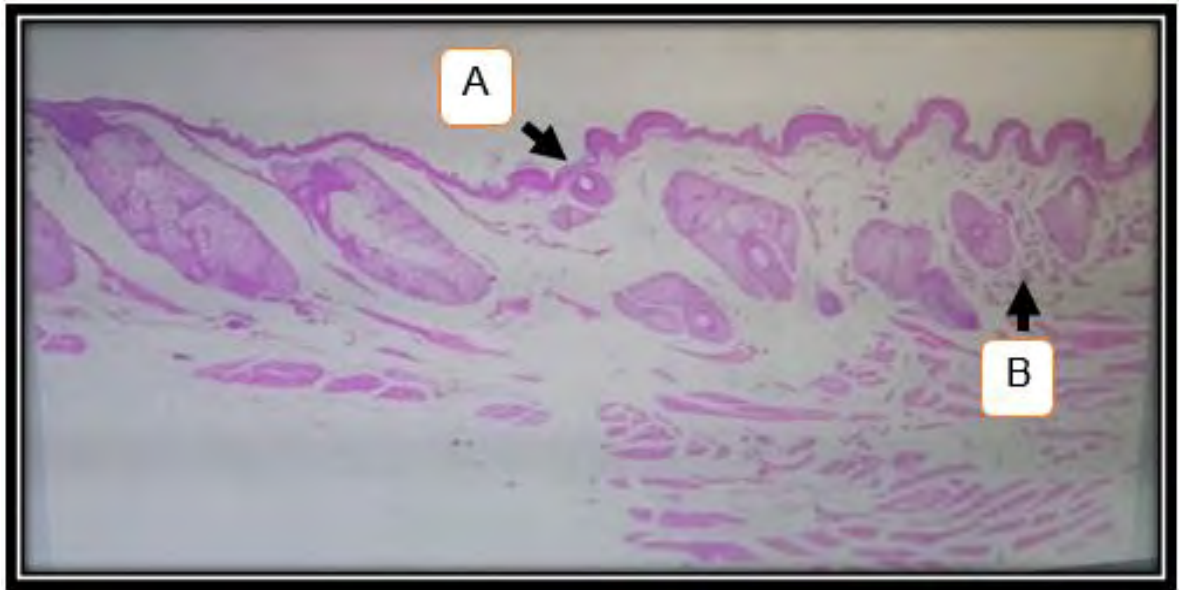


Fotografía N° 57

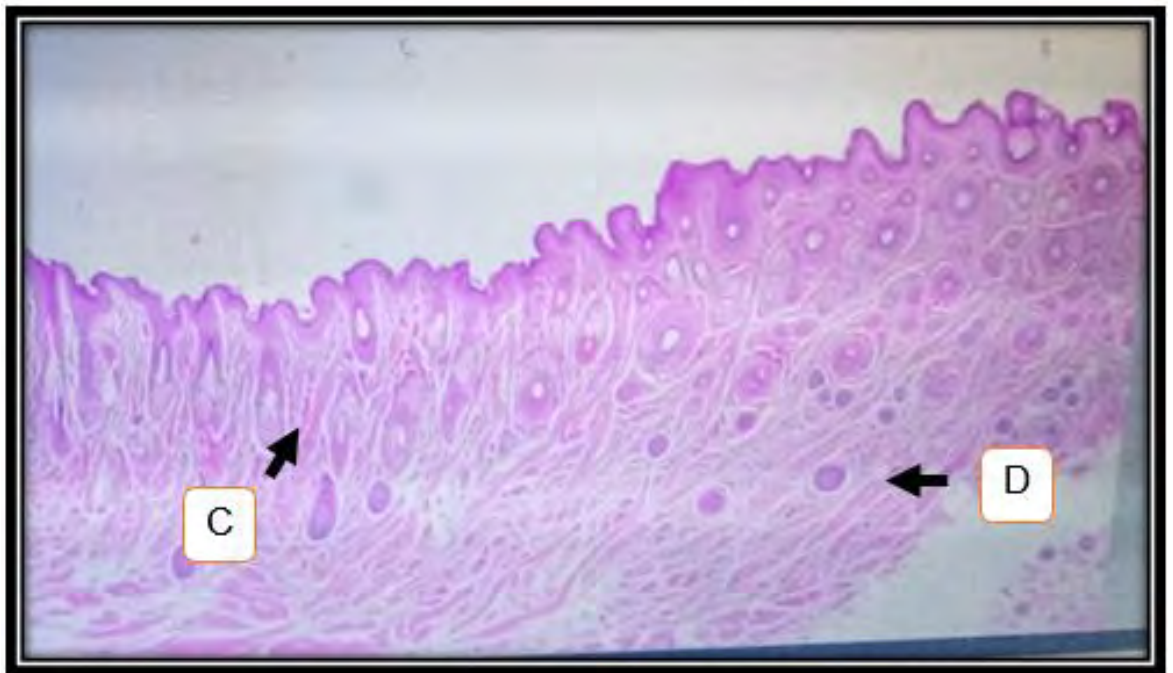


En las fotografías N° 55, 56 y 57: Se observan las muestras de la bolsa gular de los animales de experimentación contenidos en formol al 10% para el estudio histológico

Fotografía N° 58

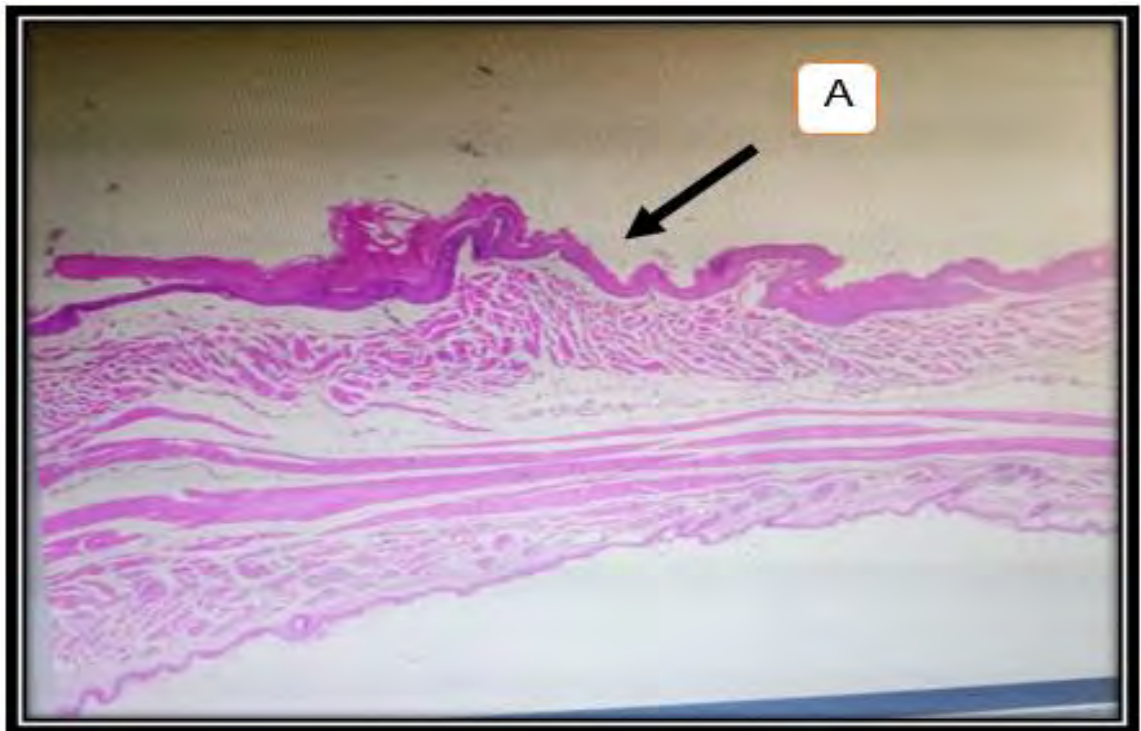


Fotografía N° 59

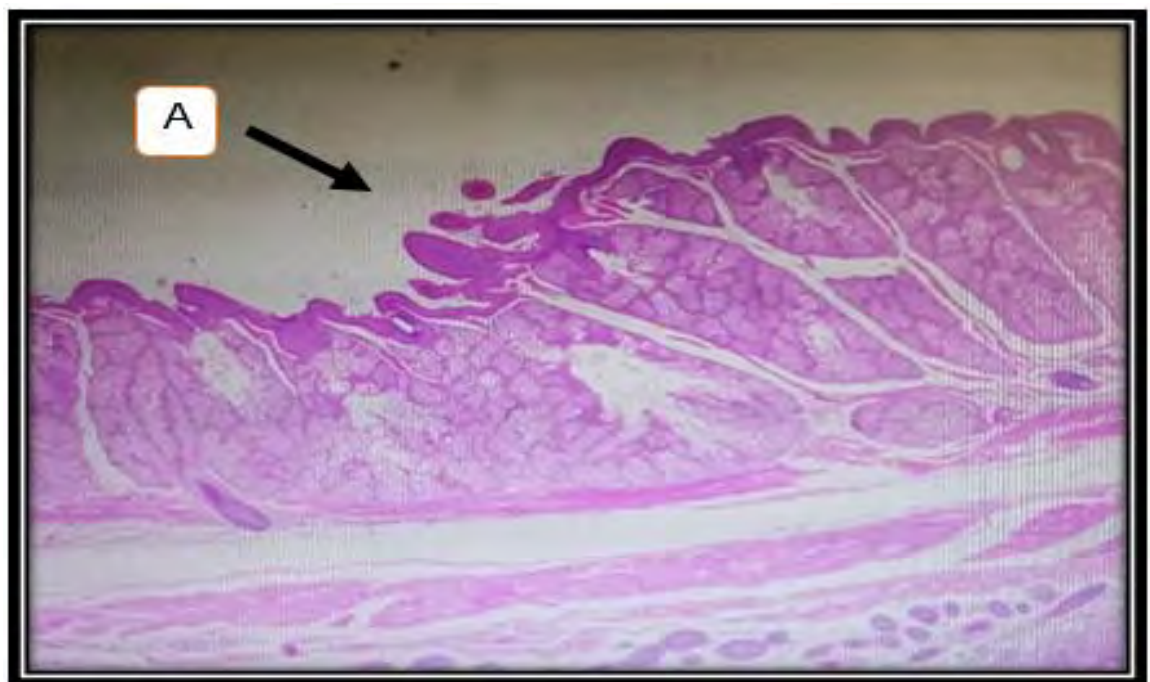


Resultados: En las fotografías N° 58 y 59 se pueden observar el examen histológico, mediante la técnica de coloración de H&E. del grupo control (agua destilada) en la cual se puede observar que no presentan alteraciones a nivel epitelial (A); infiltración de leucocitos (B), congestión vascular (C), y edema (D).

Fotografía N° 60

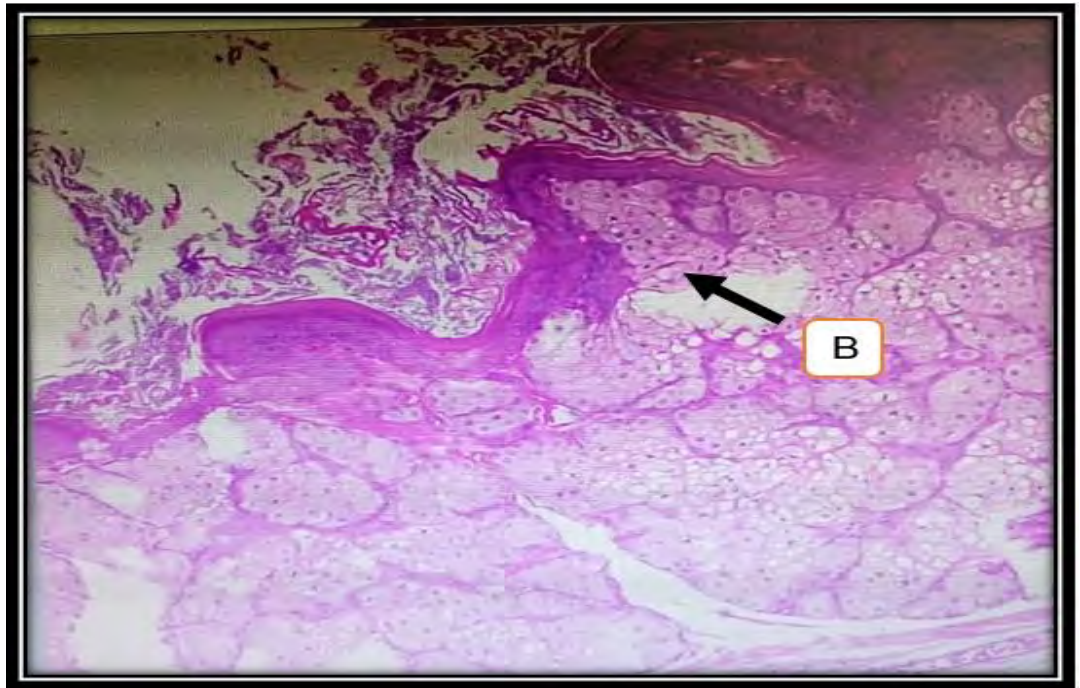


Fotografía N° 61

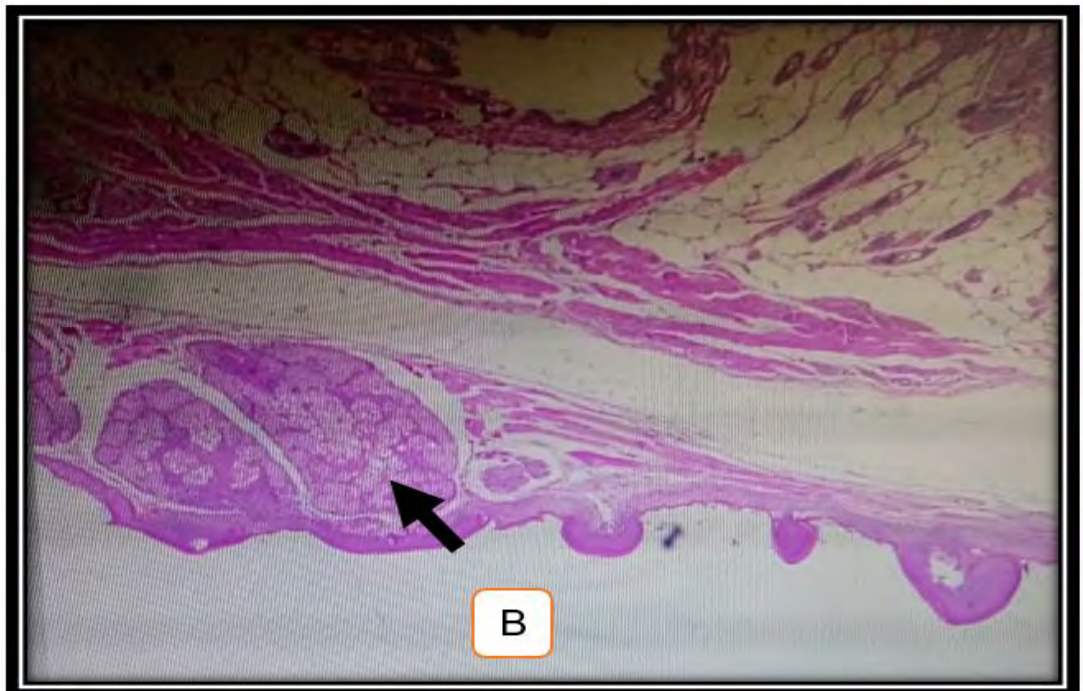


Resultados: Las fotografías N° 60; muestra el resultado del colutorio elaborado; la fotografía N° 61; muestra el resultado del colutorio listerine, microscópicamente a 40X, donde se pueden apreciar que no presentan alteraciones a nivel epitelial.

Fotografía N° 62



Fotografía N° 63

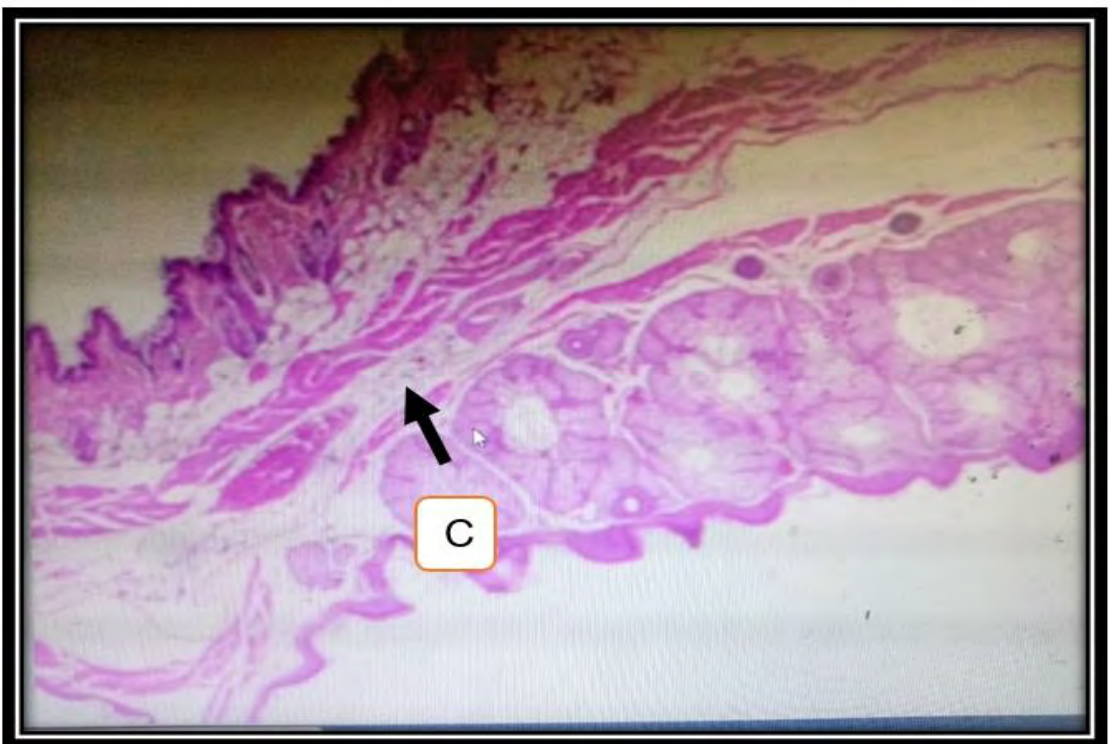


Resultados: Las fotografías N° 62; muestra el resultado del colutorio elaborado; la fotografía N° 63; muestra el resultado del colutorio listerine, microscópicamente a 40X, donde se pueden apreciar que no hay infiltración de leucocitos por campo.

Fotografía N° 64

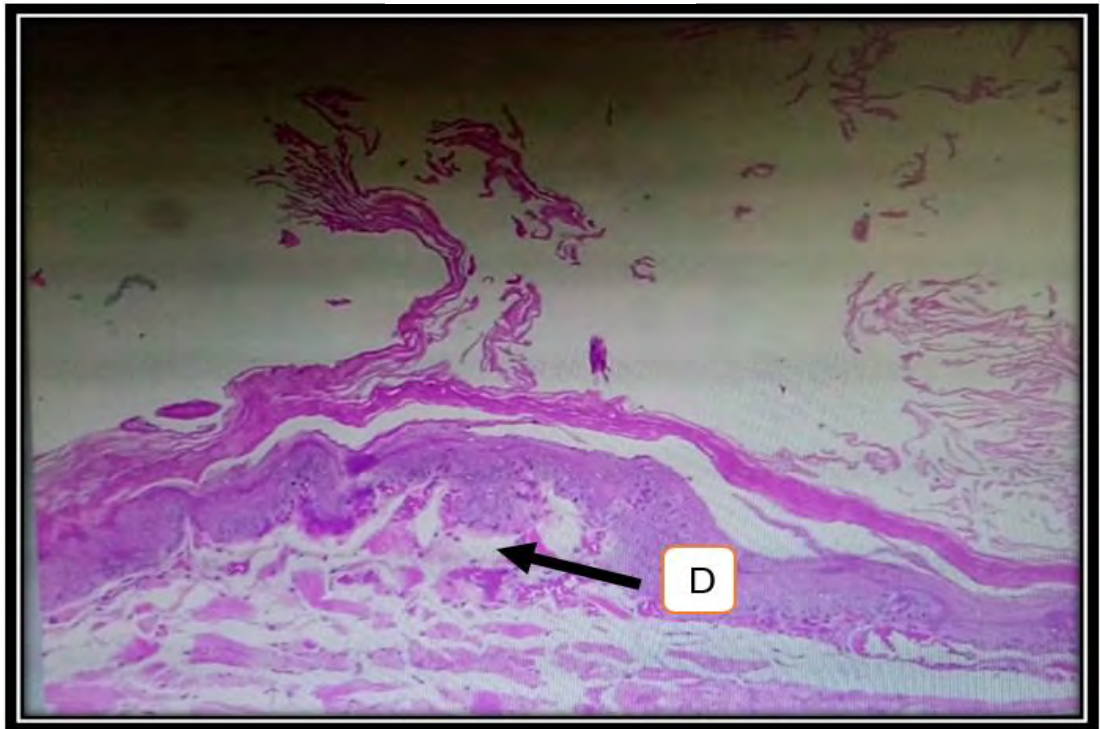


Fotografía N° 65

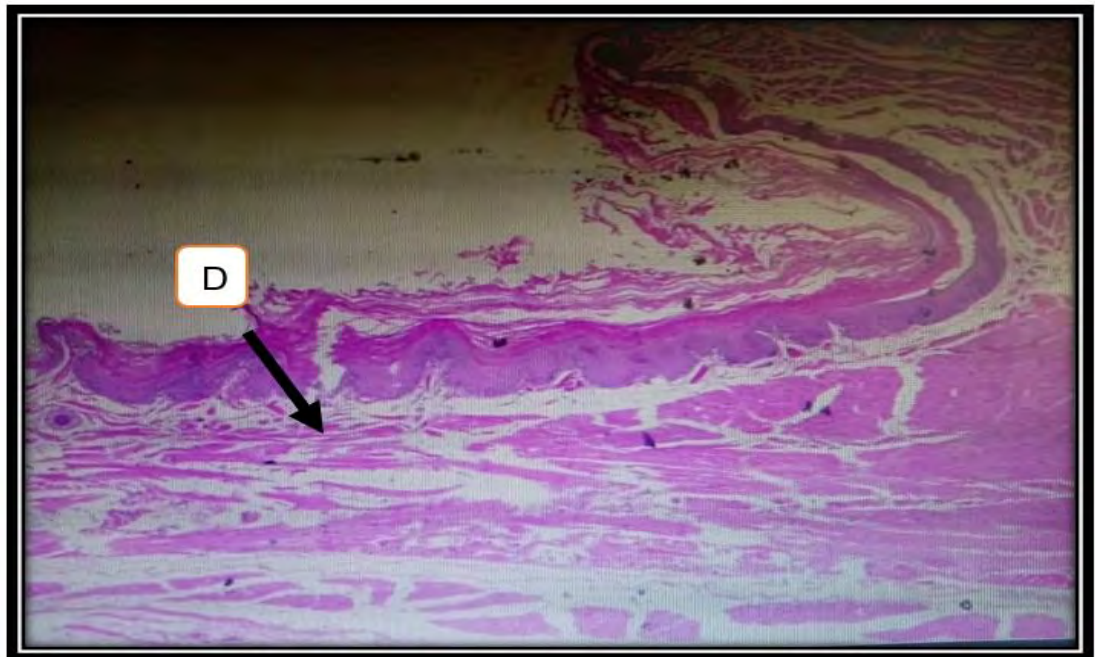


Resultados: La fotografía N° 64; muestra el resultado del colutorio elaborado, microscópicamente a 40 X en la cual se puede apreciar que está ausente la congestión vascular; la fotografía N° 65; muestra el resultado del colutorio listerine, microscópicamente a 40X, donde se pueden apreciar que hay una mínima congestión vascular.

Fotografía N° 66

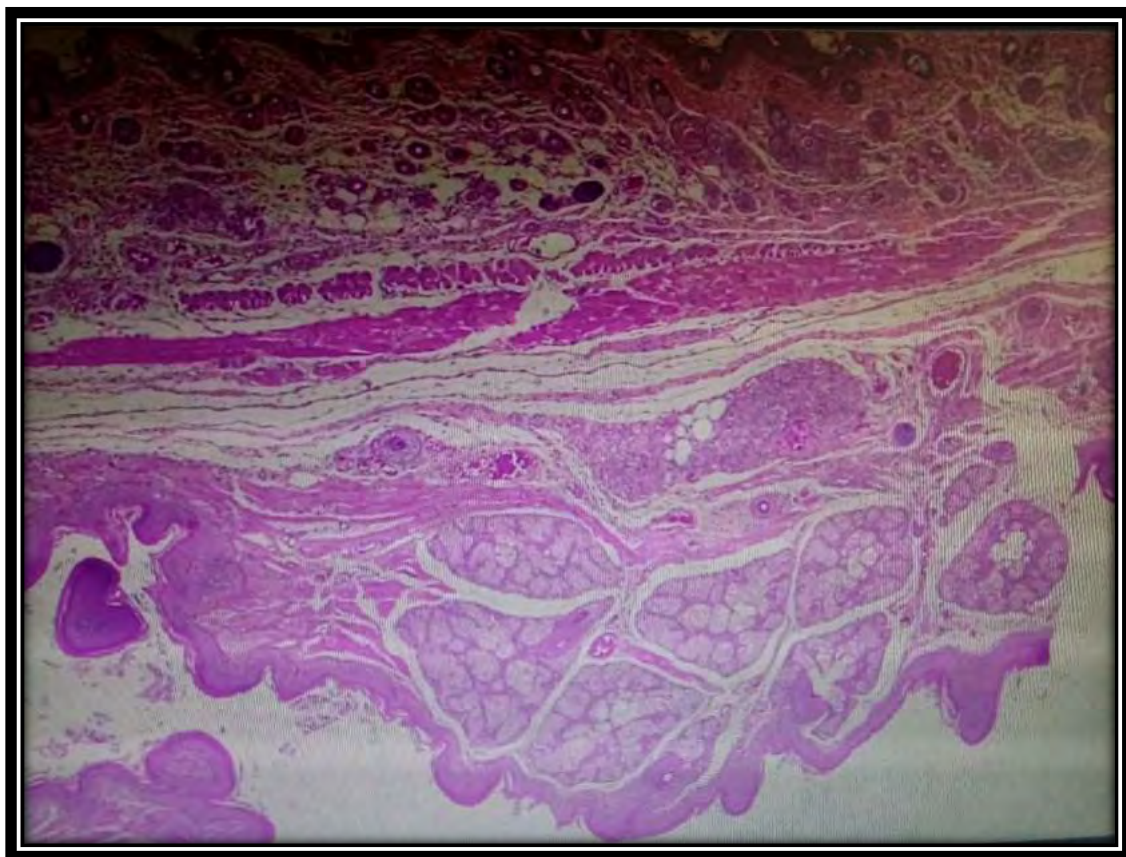


Fotografía N° 67



Resultados: La fotografía N° 66; muestra el resultado del colutorio elaborado, microscópicamente a 40 X en la cual se puede apreciar una mínima presencia de edema; la fotografía N° 67; muestra el resultado del colutorio listerine, microscópicamente a 40X, donde se pueden apreciar que no hay edema.

Fotografía N° 68



En la fotografía N 68 muestra el estudio histológico de uno de los animales de experimentación del colutorio elaborado en la cual no se observan ningún criterio de irritación.