



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
CIRUJANO DENTISTA; DENOMINA**

**EFECTO ANTIBACTERIANO *In Vitro* DEL EXTRACTO  
ALCOHÓLICO DE *Psidium guajava* y *Medicago sativa*  
SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175**

**AUTOR:**

**Bach. CHERO NEPO DIEGO ARMANDO**

**ASESOR:**

**Mg. C.D. CÓRDOVA SALINAS IMER DUVERLI**

**ASESOR ESPECIALISTA**

**MSc. Mblgo. RUIZ BARRUETO MIGUEL ANGEL**

**Pimentel - Perú  
2016**

**EFECTO ANTIBACTERIANO *In Vitro* DEL EXTRACTO  
ALCOHÓLICO DE *Psidium guajava* y *Medicago sativa* SOBRE  
*Streptococcus mutans* ATCC 25175**

Aprobación de Tesis

---

Chero Nepo Diego Armando

**Autor**

---

Mg. Esp. CD. Córdova Salinas Imer Duverli

**Asesor metodólogo**

---

M.Sc. Miguel Angel Ruiz Barrueto

**Asesor especialista**

---

Dr. Mg. Esp. CD. Jaime Uxon Plasencia Castillo  
**Presidente del jurado de tesis**

---

Mg.CD. Oskar Eduardo Prada Vidarte **Secretario  
del jurado de tesis**

---

M.Sc. Miguel Angel Ruiz Barrueto  
**Vocal del jurado de tesis**

## DEDICATORIA

El presente informe de investigación va dedicado  
a Dios todo poderoso quien nos ilumina y guía  
día a día en el camino de preparación  
profesional.

### A MI MADRE Y HERMANOS

Por su amor, su apoyo incondicional y ánimo constante, que siempre me ofrecen

con lo cual he podido lograr uno de mis objetivos,  
que es ser profesional.

### A MIS ASESORES Y JURADOS

Por su apoyo incondicional y motivación que  
permitieron la culminación con éxito de la  
presente tesis.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por ponerme en este camino.

A La Facultad de Ciencias de la Salud y a sus autoridades,

A mi querida Escuela Profesional de estomatología y a su Directora Dra. Erika  
Enoki Miñano por siempre apoyarnos,

A todos mis docentes por participar de mi formación,

A mi asesor, MSc. Miguel Angel Ruiz Barrueto, por su permanente disposición  
e incondicional apoyo, y por compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación  
a esta investigación,

A mis padres, en especial a mi madre, por su apoyo infinito, confianza y aporte  
continúo para el desarrollo de esta investigación.

## INDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
RESUMEN.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 Situación Problemática.....	9
1.2 Formulación Del problema.....	12
1.3 Justificación e Importancia.....	12
1.4 Objetivos de la Investigación.....	13
Capítulo II. Marco Teórico.....	14
2.1. Antecedentes.....	14
2.2. Marco Conceptual.....	19
2.2.1. <i>Psidium guajava</i> “guayaba”.....	19
2.2.1.1. Composición química:.....	19
2.2.1.2. Actividad farmacológica de principios activos.....	19
2.2.1.3. Actividad antidiarreica.....	20
2.2.2. <i>Medicago sativa</i> “alfalfa”.....	20
2.2.3. Flora microbiana oral.....	21
2.2.3.1. <i>Streptococcus mutans</i> .....	21
2.2.4. Definición de Términos Básicos.....	26
CAPÍTULO III. Marco Metodológico.....	28
3.1.2. Diseño de investigación:.....	28
CAPÍTULO IV. ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS.....	38
Anexos.....	57

## RESUMEN

Se determinó el efecto de antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los ensayos consistieron en 20 concentraciones volumétricas de cada extracto (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 mg/ml), un control positivo que fue clorhexidina al 0,12% y el control negativo que fue etanol absoluto. Para evaluar el efecto antibacteriano de ambos extractos alcohólicos se utilizó el método de difusión en disco y para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se utilizó el método de microdilución en caldo. La lectura de los resultados para el método de difusión en disco se hizo midiendo el diámetro de los halos de inhibición y se reportó en milímetros. Se determinó que tanto la CMI como la CMB fue < 1 mg/ml. La mayor inhibición se encontró con el extracto alcohólico de *Psidium guajava* y fue a la concentración de 18 mg/ml obteniéndose un halo superior a los 28 mm. En el caso del extracto alcohólico de *Medicago sativa* la mayor inhibición se obtuvo a la concentración de 9 mg/ml pero dicha inhibición no fue significativa. Se presume que el efecto del extracto pudo deberse a los compuesto fenólicos presentes en la planta cuyos efectos bactericidas están bien descritos. Se concluye que no existe efecto antibacteriano sinérgico entre los extractos alcohólicos de las hojas de *Medicago sativa* y *Psidium guajava* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 cuyos halos de inhibición obtenidos fueron menores al control negativo.

**Palabras claves:** Antibacteriano, *Streptococcus mutans*, *Psidium guajava*, *Medicago sativa*.

## ABSTRACT

Antibacterial effect in vitro of *Psidium guajava* alcoholic extract of *Medicago sativa* and ATCC 25175. *Streptococcus mutans* on determined assays consisted of 20 volume concentrations of each extract (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 and 20 mg / mL), a positive control was 0.12% chlorhexidine and the negative control was absolute ethanol. To evaluate the antibacterial effect of both alcoholic extracts the disk diffusion method was used and to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CMB) the broth microdilution method was used. The reading of the results for the disk diffusion method was done by measuring the diameter of the inhibition halos and reported in millimeters. It was determined that both CMI and WBC was <1 mg / ml. The greatest inhibition was found with alcoholic extract of *Psidium guajava* and went to the concentration of 18 mg / mL obtained more than 28 mm halo. In the case of alcoholic extract of *Medicago sativa* greater inhibition was obtained at a concentration of 9 mg / mL but such inhibition was not significant. It is presumed that the effect of the extract could be due to the phenolic compound present in the plant whose bactericidal effects are well described. It is concluded that there is no synergistic antibacterial effect between alcoholic extracts from the leaves of *Medicago sativa* and *Psidium guajava* on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 inhibition halos which were obtained under the negative control.

**Keywords:** Anti-Bacterial, *Streptococcus mutans*, *Psidium guajava*, *Medicago sativa*.

## INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial que se caracteriza por un biodinamismo molecular, en la cual se genera una interacción directa

entre microorganismos y el órgano dental. Es una de las patologías de la cavidad oral más prevalentes en el mundo siendo una de las principales causas de la destrucción y pérdida dentaria. Esta afección ocupa el segundo lugar en la tabla de morbilidad general a nivel nacional y la tercera ubicación en la etapa de la niñez con un 9.1%, solamente superada por las infecciones de las vías respiratorias agudas y las infecciones intestinales<sup>1</sup>.

Por otro lado la bacteria que constituye la primera causa de caries dental y de infecciones graves a nivel oral es el *Streptococcus mutans* principalmente por su alto poder criogénico y su alto grado de patogenicidad, es capaz de deteriorar el diente y generar una mayor complicación en los tejidos circundante. Actualmente los métodos de control de microorganismos orales, se centran en el uso de productos químicos, cuyos efectos colaterales están bien reportados por ello otra alternativa de control microbiano es el uso de especies vegetales que constituyen una fuente importante de principios activos que darán origen a nuevos fármacos.

El uso excesivo de compuestos antimicrobianos de origen químico ha propiciado el aumento de la inmunodepresión en población y la creciente resistencia a los antibióticos, lo que constituye una amenaza mundial según señala la OMS<sup>2</sup>. Investigaciones precedentes las plantas son fuente abundante de principios activos con propiedades farmacológicas que podrían ser utilizados para el control de microorganismos de importancia

estomatológica.

Entre las plantas que presentan principios activos con actividad antibacteriana demostrada encontramos a la alfalfa y la guayaba, cuyas investigaciones precedentes informan que han sido utilizadas en el control de microorganismos

Gram negativos, en la presente investigación se busca determinar su efectividad antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans*, un microorganismo oral importante en el desarrollo de caries dental.

La importancia de este microorganismo a nivel estomatológico propició el deseo de realizar esta investigación con la finalidad de determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, empleando para ello el método de difusión en agar por discos y el Test de Microdilución en caldo.

La importancia de esta investigación radica en que propiciará los cimientos para el desarrollo de investigaciones de tipo tecnológicas mediante las cuales se puedan diseñar y formular nuevos productos que ayuden a combatir a aquellos microorganismos patógenos orales sin que existan efectos colaterales y que puedan estar al alcance de la población.

## **CAPÍTULO I. PROBLEMA DE LA INVESTIGACION**

### **1.1 Situación Problemática**

La caries dental es una enfermedad crónica, infecciosa, multifactorial y transmisible. Por su magnitud y trascendencia constituye un importante problema de salud pública. Según La Organización Mundial de la Salud (OMS) la caries dental es un proceso localizado que se inicia después

de la erupción dentaria, determina el reblandecimiento del tejido duro del diente y evoluciona hacia la formación de una cavidad<sup>1</sup>. *Streptococcus mutans* es una de las bacteria que constituye la primera causa de caries dental y de infecciones graves por estreptococos del grupo viridans.

Se ha establecido que el 90% de las personas, en las ciudades industrializadas son afectadas por infecciones bucodentales de origen bacteriano. También se ha determinado que la mayoría de estas utilizan productos químicos para su control, productos que generalmente son de costo elevado, difícil acceso y comprobados efectos colaterales (OMS)<sup>28</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), afirma que las enfermedades bucodentales, como la caries dental, la enfermedad periodontal y la mal oclusión constituyen problemas de salud pública que afecta a los países industrializados y cada vez con mayor frecuencia a los países en desarrollo, en especial a las comunidades más pobres<sup>28</sup>.

Las enfermedades bucodentales comparten factores de riesgo con las enfermedades crónicas más comunes como las enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades respiratorias crónicas y diabetes. Siendo el factor de riesgo más importante una higiene bucodental deficiente. La atención odontológica curativa tradicional representa una importante carga económica para muchos países de ingresos altos, donde el 5%-10% del gasto sanitario público guarda relación con la salud bucodental<sup>28</sup>.

La Salud Bucal en el Perú constituye un grave problema de Salud Pública, por lo que es necesario un abordaje integral del problema, aplicando medidas eficaces de promoción y prevención de la salud bucal. La población pobre al igual que la no pobre, presenta necesidades de tratamiento de enfermedades bucales, solo que la población pobre, tiene que verse en la necesidad de priorizar, entre gasto por alimentación y gasto por salud<sup>28</sup>.

Según el Estudio Epidemiológico a nivel nacional realizado los años 2001-2002 la prevalencia de caries dental es de 90.4%; además en lo que se refiere a caries dental el índice de dientes cariados, perdidos y obturados, a los 12 años es de aproximadamente 6, ubicándose según la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en un País en estado de emergencia; según un estudio del año 1990, la prevalencia de enfermedad periodontal fue de 85% y en estudios referenciales se estima que la prevalencia actual de maloclusiones es del 80%<sup>28</sup>.

Actualmente existe un interés muy grande por investigar nuevas formas terapéuticas para combatir las afecciones orales, pero la mayoría de estudios es a nivel internacional y están relacionadas con el uso de extractos vegetales y otras sustancias inocuas para los tejidos orales. Como bien sabemos, las plantas han sido utilizadas por la humanidad en todo el mundo desde tiempos remotos para controlar e incluso curar afecciones causadas por microorganismos<sup>2</sup>.

Por otro lado se ha demostrado que algunos principios activos de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* poseen propiedades antimicrobianas <sup>29</sup>. A nivel nacional y local no se han encontrado investigaciones que puedan servir como antecedentes para la presente investigación. De allí su interés para determinar la capacidad antibacteriana de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* frente a microorganismos orales de importancia odontológica como es el *Streptococcus mutans*.

## **1.2 Formulación Del problema**

¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

## **1.3 Justificación e Importancia**

La caries dental es una enfermedad preponderante en la cavidad bucal, siendo una lesión progresiva que destruye el diente, según el

Ministerio de Salud esta afección es una de las que contribuye a generar un bajo rendimiento escolar en los niños. Esta afección ocupa el segundo lugar en la tabla de morbilidad general a nivel nacional y la tercera ubicación en la etapa de la niñez con un 9.1%, solamente superada por la infecciones de las vías respiratorias agudas y las infecciones intestinales<sup>1</sup>.

Las especies vegetales son una fuente importante de nuevos fármacos, los que tienen una creciente demanda en compuestos antimicrobianos debido al aumento de la población con inmunodepresión y a la creciente resistencia a los antibióticos, lo que

constituye una amenaza mundial según señala la OMS<sup>2</sup>. Investigaciones precedentes con plantas han demostrado que tienen principios activos con propiedades farmacológicas que pueden ser utilizados para el control de microorganismo causantes de enfermedades en la cavidad oral.

La presente investigación permitió evaluar el efecto antibacteriano de los extractos alcohólicos de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, determinándose la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Estos resultados al ser significativos nos permiten generar la base científica para la elaboración de productos a base de estas plantas que puedan actuar como alternativa de control de *Streptococcus mutans* contribuyendo así al control de microorganismos patógenos orales. En vista de la situación que se ha comentado la presente investigación buscó determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

#### **1.4 Objetivos de la Investigación**

##### **Objetivo General**

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y de *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

##### **Objetivos Específico**

- I. Determinar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de las hojas *Psidium guajava* sobre *Streptococcus mutans*, según concentración.
- II. Determinar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de las hojas *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans*, según concentración.
- III. Determinar el efecto sinérgico de la mezcla de los extractos alcohólico de las hojas de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans*.

## Capítulo II. Marco Teórico

### 2.1. Antecedentes

Nelce M. et al (2014) en su estudio “Actividad antimicrobiana de los taninos obtenido del extracto de las hojas de guayaba (*Psidium guajava* L) sobre microorganismos patógenos”; ejecutaron un estudio que tuvo como objetivo determinar las actividades antimicrobianas de extractos de tanino de las hojas de guayaba contra patógenos microbianos. El método utilizado para el análisis cualitativo con los taninos están formados por la intensidad del color es verde negrozco de compuestos FeCl<sub>3</sub>. En la Prueba de actividad antimicrobiana, fue utilizando el

método de difusión en agar. Los resultados mostraron niveles de taninos en las hojas de guayaba con etanol 30 %, el cual es 2,351 mg / g, etanol al 50% es 1,728 mg g, 70% de etanol es 1,835 mg / g. El mejor disolvente para extraer los más altos niveles de taninos con etanol al 30 % en el valor de los niveles de taninos 2.351mg / g. Actividad inhibidora de tanino en cinco patógenos microbianos diferente. Esto es porque la composición de la pared celular del quinto microbio es diferente. Los resultados mostraron que los extractos taninos pueden inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans*<sup>3</sup>.

Shital Ch.et al. (2015). Evaluación de la actividad antibacteriana y tamizaje fitoquímico de Hojas *Medicago sativa*. Evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de varios extractos de hojas de *Medicago sativa*, fue evaluada contra patógenos de importancia clínica. La actividad antimicrobiana fue evaluad por el método de difusión en disco y el método de ensayo de turbidez contra tres bacterianas patógenos. El resultado demostró que el extracto metanólico de las hojas *Medicago sativa* tiene actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas<sup>5</sup>.

Biswas B.et al 2013) Actividades antimicrobianos de extractos de hojas de Guayaba (*Psidium guajava*) en dos Gram Negativo y bacterias Gram-positivas. Realizaron un estudio para determinar el potencial antimicrobiano de extractos de guayaba (*Psidium guajava*) de la hoja contra dos bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella*

*enteritidis*) y dos bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*), que son algunas de las bacterias transmitidas por los alimentos y de descomposición. Las hojas de guayaba se extrajeron en cuatro diferentes disolventes de polaridades crecientes (hexano, metanol, etanol, y agua). La eficacia de estos extractos se ensayó frente a las bacterias a través de un método de difusión empleando 50 l solución de extracto de hojas por pocillo. Según los resultados del ensayo antibacteriano, los extractos de metanol y etanol de las hojas de guayaba mostraron actividad inhibitoria frente a bacterias Gram-positivas, mientras que las bacterias Gram-negativas eran resistentes a todos los extractos de disolventes. El extracto de metanol tuvo una actividad antibacteriana con zonas medias de la inhibición de 8,27 y 12,3 mm , y el extracto de etanol tenía una zona media de la inhibición de 6,11 y 11,0 mm frente a *B. cereus* y *S. aureus* , respectivamente . Sobre la base del presente hallazgo, se recomienda determinar los valores antimicrobianos e investigar otras propiedades farmacológicas <sup>4</sup>.

Miranda C. et al (2012) en su investigación, Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L., *Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea* L, evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y hexánico de hoja y corteza de cuatro plantas utilizadas como medicinales: guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* L.), palo de sangre (*Pterocarpus hayesii* L.), chichimecate (*Tynanthus guatemalensis* L.) y ciruela (*Spondias purpurea* L.). La actividad antimicrobiana se evaluó contra

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mediante el método de difusión en agar. Los resultados indican que el extracto hexánico de cada una de las plantas presentaron actividad antimicrobiana al menos en uno de los microorganismos evaluados mientras que los extractos hexánicos de corteza no presentaron actividad contra ninguno de los dos microorganismos ensayados. Los extractos que presentaron una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) igual o menor de 7.50 mg mL<sup>-1</sup> contra *S. mutans* fueron los etanólicos de hoja de *P. friedrichsthalianum* y *S. purpurea* y el hexánico de hoja de *T. guatemalensis* así como el extracto hexánico de corteza de *P. friedrichsthalianum* contra *S. aureus* y *S. mutans*<sup>30</sup>.

Aliahmadi A. et al (2011) con respecto de la importancia de encontrar nuevos fármacos antibacterianos. En su estudio presenta la aplicación de un método simple descrito previamente para el cribado de diferentes semillas de plantas con el fin de encontrar los mejores recursos en las plantas. De las 10 diferentes semillas fueron extraídos proteínas solubles en agua y fueron sometidos al método SDS-PAGE y la subsiguiente en agar-overla y se realizaron bioensayos. Estándar de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecium* fueron incluidos en los bioensayos. Este método también se utilizó para las proteínas precipitadas por el sulfato de amonio que asegura la naturaleza proteica de las sustancias de ensayo. El tamaño molecular y las cantidades efectivas de los péptidos fueron estimados usando Tricin-SDS-PAGE y la densitometría. Se encontró que dos de las diferentes semillas mostraron actividad antibacteriana notable

probado contra las bacterias Gram positivas y un moderado efecto inhibitorio sobre Gram negativos. Se concluyó que las sustancias antibacterianas eficaces son péptidos de peso molecular ligeramente mayor de 5 kDa. Sobre la base de los resultados de experimentos de agar-overlay y por proyección de 10 diferentes semillas de hierbas, podríamos introducir semillas de *M. sativa* L. y *Onobrychis sativa* Lam., como grandes fuentes de planta putativo que poseen péptidos antibacterianos. El método propuesto de selección puede utilizarse para la detección de un gran número de diferentes semillas de plantas e incluso a otras partes del cuerpo de la planta<sup>6</sup>.

Doss, A. et al (2011) En su investigación, realizaron una evaluación antibacteriana y análisis fitoquímico de *Medicago sativa* L. contra algunos microbios patógenos. Disolvente del extracto a saber, Éter de petróleo, cloroformo, benceno, metanol, etanol y agua de *Medicago sativa* se evaluó la actividad antibacteriana, contra siete cepas bacterianas importantes por método de difusión en agar. El extracto de metanol mostró actividad significativa contra todas las bacterias probadas seguida de cloroformo y extracto de etanol. El benceno y los extractos de éter de petróleo no mostraron ninguna actividad significativa. La actividad antibacteriana es más significativa en extractos de disolvente en comparación con el extracto acuoso en todas las plantas, lo que indica que el principio activo responsable de la actividad antibacteriana es más soluble en disolventes orgánicos<sup>7</sup>.

## 2.2. Marco Conceptual

### 2.2.1. *Psidium guajava* “guayaba”.

#### 2.2.1.1. Composición química:

Se ha establecido que las hojas de esta planta contienen taninos y fenoles, flavonoides y triterpenos y esteroides, así como de saponinas y compuestos aminados<sup>8</sup>. Se ha reportado un aceite esencial y otras sustancias volátiles<sup>8</sup>. Contiene, además, ácido guajanoico,  $\beta$ -sitosterol, uvaol, ácido oleanólico y ácido ursólico; ácido 2- $\alpha$ -hidroxiursólico, morin-3-O- $\alpha$ -L-arabopiranosido, hiperina, miricetina-3-O- $\beta$ -D-glucosido, quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronopiranosido, 1-O-galoil- $\beta$ -D-glucosa<sup>8</sup>. Se ha informado la presencia de ácido ascórbico y de otros flavonoides así como azúcares reductores y alcaloides. Se ha aislado una nueva benzofenona y un flavonol de naturaleza galoil-glicósido, conjuntamente con 5 nuevos quercetin-glicósidos. Se ha informado el aislamiento de nuevos flavonoides y de 4 nuevos triterpenos<sup>9</sup>.

#### 2.2.1.2. Actividad farmacológica de principios activos

El extracto acuoso de las hojas, en dosis de 50-800 mg/kg, vía intraperitoneal, produce un efecto antiinflamatorio en ratas *Wistar* y analgésico en ratones *Balb/c*; (ambos efectos son dosis dependiente)<sup>8</sup>. Se reportó actividad antiinflamatoria, en el modelo de inflamación aguda inducido por carragenina en ratas *Wistar*.

### **2.2.1.3. Actividad antidiarreica**

Se ha reportado actividad antibacteriana de amplio espectro para el extracto de las hojas<sup>7</sup>. Comparando los extractos acuosos, alcohólicos y cetónicos de las hojas, frente a veinte cepas de bacterias de interés clínico. El extracto acuoso mostró actividad en el 35% de los casos, el alcohólico en un 65% y el cetónico en el 100% de los casos<sup>10</sup>.

Se señala que la sustancia activa del extracto de hojas es la quercetina. Se ha verificado el efecto espasmolítico que produce. Se ha reportado un efecto dosis dependiente en dosis de 50 a 400 mg/kg (oral) con una disminución de la motilidad intestinal y retardo en el vaciado gástrico. El extracto acuoso de las hojas, disminuye la producción de toxinas lábiles de *E. coli* y del cólera. Un ensayo clínico realizado concluyó que la tintura al 20% de hoja de *Psidium guajava* tiene efecto antidiarreico importante. En otro, que evaluó el polvo de las hojas secas, también se comprobó este efecto<sup>10</sup>.

### **2.2.2. *Medicago sativa* “alfalfa”**

La Alfalfa, *Medicago sativa*, es una planta perenne leguminosa originaria de Asia que puede llegar a alcanzar los 80 cm de altura. Presenta hojas trifoliadas y con inflorescencias con flores violeta en racimo. Es una planta que se adapta bien tanto a climas calurosos con falta de agua como a temperaturas bajas. Contiene vitaminas A, del grupo B (B1, B3, B5, B6, B7, B9, B12), C, D, E, K y P, minerales como el calcio, cobalto, boro, cobre, potasio, hierro, fósforo,

magnesio, manganeso, sodio, zinc, selenio o cromo, proteínas vegetales, flavonoides, clorofila, cumarinas, enzimas digestivas, saponinas, fitoesteroles y fitoestrógenos. Es por esto que la alfalfa posee propiedades antiartríticas, alcalinizantes, antibacterianas, anticolestémicas, antidiabéticas, antiespasmódicas, antipiréticas, antihemorrágicas, antirreumáticas, aperitivas y antiviral<sup>11</sup>.

### **2.2.3. Flora microbiana oral**

Los microorganismos que forman lo que se denomina flora de la saliva son todos los que se han desprendido de los sitios diversos de la cavidad bucal en donde se han asentado poblaciones bacterianas (piezas dentarias, lengua, mucosa de los carrillos y membranas mucosas de la faringe). En general predominan los cocos Gram positivos anaerobios facultativos (en torno al 44 %), los cocos Gram negativos anaerobios estrictos como *Veillonella* sp. (Alrededor del 15 %), y los bacilos anaerobios facultativos Gram positivos, destacando las especies de *Actinomyces*. También treponemas comensales, hongos como *Candida* sp., *Mycoplasma* sp., y los escasos protozoos aislados en la cavidad oral<sup>12 13</sup>.

#### **2.2.3.1. *Streptococcus mutans***

De acuerdo a numerosos estudios se ha demostrado la existencia de gran cantidad de bacterias que se encuentran en la cavidad bucal, entre ellos se localizan los microorganismos pertenecientes al género *Streptococcus*. Los *Streptococcus* son bacterias que presentan en forma de coco esférica u ovoidea, se agrupan en cadenas de longitud variable esta formación de

cadena se debe a que los microorganismos permanecen adheridos por una parte de la pared celular, no tienen movimiento, no forman esporas y generalmente reaccionan positivamente a la coloración de Gram, presentan prolongaciones extracelulares del tipo de las fimbrias y pueden tener capsula<sup>15 16</sup>.

Los medios de vida son el tracto respiratorio, gastrointestinal y bucal del hombre, crecen a una temperatura de 37°C, el medio de cultivo debe ser sólido con presencia de sangre y líquidos tisulares. Su metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que disminuyen mucho el pH. Los *Streptococcus* representan un amplio grupo de microorganismos: algunos forman parte de la microbiota normal sin que se haya demostrado su patogenicidad, otros por el contrario se comportan como saprofitos, comensales e incluso patógenos produciendo diversas infecciones en el hombre<sup>17 18</sup>

22.

#### **2.2.3.1.1. Componentes del grupo mutans**

El grupo mutans está constituido por las especies *S. mutans*, *rattus*, *crictus*, *sobrinus*, *ferus*, *downei* y *macacae*. Pero por el interés que la presente investigación tiene solo se hablará a fondo del *S. mutans*<sup>16</sup>. Son anaerobios facultativos, la temperatura óptima de desarrollo es de 36°C, una práctica aconsejable es incubar las placas inoculadas 24

horas en anaerobiosis y posteriormente 24 horas en aerobiosis lo que favorece la formación de peróxido que es un carácter diferencial por la síntesis de polisacáridos extracelulares que facilita el reconocimiento de las colonias

21 22.

Los medios de cultivo en los que se puede obtener colonias de *S. mutans* son: Agar sangre de carnero: crecen cepas alfa hemolíticas (destruyen parcialmente los eritrocitos), beta hemolíticas (destruyen totalmente los eritrocitos) y gama hemolíticas (no tienen actividad destructora sobre los eritrocitos) Agar mitis-salivarius (MSA) que contiene un 5 por 100 de sacarosa y como sustancias inhibidoras telurito potásico, azul tripán y cristal violeta, este medio es poco selectivo <sup>22</sup>.

Mitis-salivarius-bacitracina (MBS) contiene agar mitissalivarius al que se le añade 0.2 u/mL de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100. Este medio es muy selectivo y es el que se utilizó para realizar la técnica “aislamiento y cuantificación de *S. mutans* en saliva” técnica descrita y llevada a cabo en esta investigación<sup>22</sup>.

Agar con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina se ha desarrollado debido a que no es inhibidor del serotipo *Streptococcus criceteus* como en el caso de los

medios de cultivo anteriores los cuales inhiben completamente al microorganismo. Las colonias en agar mitis-salivarius MSA y mitis-salivarius-bacitracina MSB aparecen elevadas, convexas, onduladas, opacas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas, y cuando producen polisacáridos extracelulares aparece una burbuja de color brillante rodeándolas<sup>22</sup>.

#### **2.2.3.1.2. *Streptococcus mutans* como iniciador de caries dental** El

*Streptococcus mutans*, fue aislado por Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas en humanos, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, que se puede encontrar como coco (forma redonda) en un medio alcalino, o en forma de cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido. Esta bacteria es anaeróbica facultativa, es decir, puede utilizar el oxígeno para crecer, pero si éste no está presente también puede sobrevivir; sin embargo su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis<sup>23</sup>.

#### **2.2.3.1.3. Factores de virulencia del *Streptococcus mutans***<sup>25</sup>

Los factores de virulencia o características del *Streptococcus mutans* que lo hacen patógeno son:

- Acidogenicidad: el *Streptococcus* puede fermentar los azúcares de la dieta y producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo.
- ocasionando que el pH baje y se desmineralice el esmalte.
- Aciduricidad: capacidad del *Streptococcus* para producir ácido en un medio.
- Acidofilicidad: el *Streptococcus* puede resistir la acidez del medio, propiedad, que es muy necesaria para sobrevivir y desarrollarse en un pH bajo.
- Producen dextranasas y fructanasas enzimas que son capaces de metabolizar los polisacáridos extracelulares favorece la producción de ácido y constituye un sustrato en los periodos en que disminuye el aporte de oxígeno.
- Corto efecto post-pH: requiere de poco tiempo para recuperar su actividad de crecimiento habitual tras ser sometido a un pH bajo.

#### **2.2.3.1.4. Factores de cariogenicidad del *Streptococcus mutans*<sup>24</sup>:**

Las principales características que tiene el *Streptococcus mutans* para iniciar un proceso carioso son:

- Producción de polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa que se adhiere firmemente al diente y la bacteria fácilmente se adhiere a ellos.
- Elementos que determinan fenómenos de adhesión, agregación y coagregación.
- Producción y metabolismo de polisacáridos

intracelulares.

- Producción de dextranasas y fructanasas.

Rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos. Efecto post-pH corto. Pueden conseguir un pH crítico de 5.5 necesario para iniciar el proceso de desmineralización del esmalte, estos microorganismos lo logran más rápidamente que cualquier otro presente en la placa dental.

#### 2.2.4. Definición de Términos Básicos

- **Concentración:** Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en el sistema internacional es el mol por metrocúbico ( $\text{mol}/\text{m}^3$ )<sup>27</sup>.
- **Extracto:** Producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales<sup>27</sup>.
- **Antibacteriano:** Capacidad de matar o destruir o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena<sup>27</sup>.
- **U.F.C:** Es el número mínimo de células separables sobre la superficie, o dentro, de un medio de agar semi-sólido que da lugar al desarrollo de una colonia.
- **In vitro:** Producido en el laboratorio por métodos experimentales<sup>27</sup>.
- **Principios activos:** son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal.

- **Inoculación:** Acción y efecto de Inocular <sup>27</sup>.
- **Inocular:** Introducir en un organismo una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad <sup>24</sup>.
- ***Psidium guajava*:** planta cuyo Fruto es de forma aovada, del tamaño de una pera mediana, de varios colores, y más o menos dulce, con la carne llena de unos granillos o semillas pequeñas <sup>27</sup>.
- ***Medicago sativa*:** *Medicago sativa*, es una planta perenne leguminosa originaria de Asia que puede llegar a alcanzar los 80 cm de altura<sup>11</sup>.
- **Inhibición:** Acción y efecto de inhibir o inhibirse <sup>26</sup>.
- **Bacteriostático:** Que impide la proliferación de bacterias <sup>27</sup>.
- **Bactericida:** Que destruye las bacterias <sup>27</sup>.
- **Concentración mínima inhibitoria:** es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible), I (intermedia) y R (resistente).
- **Concentración mínima bactericida:** es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.

## **CAPÍTULO III. Marco Metodológico**

### **3.1. Tipo y Diseño de la investigación**

#### **3.1.1. Tipo de investigación:**

Según la naturaleza de la investigación es una investigación básica.

Según la intervención del investigador es una

investigación de tipo experimental. Según la planificación de las mediciones prospectivo. Según el número de mediciones de la variable de estudio longitudinal

#### **3.1.2. Diseño de investigación:**

Investigación experimental verdadera con diseño de estímulo creciente con doble control.

### **3.2. Población**

Un cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### **3.3. Muestra**

Estuvo conformada por 100  $\mu$ L de una suspensión bacteriana obtenida a partir de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, esta suspensión fue equivalente al tubo N° 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) del nefelómetro de MacFarland.

### **3.4. Unidad de Análisis**

La unidad de análisis estuvo constituida por una placa Petri sembrada con 100  $\mu$ L de suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### 3.5. Cálculo del número de duplicados de unidades de ensayo

El número de duplicados para cada ensayo se determinó aplicando la siguiente fórmula estadística que es aplicable en investigaciones experimentales para determinar el número mínimo de observaciones, duplicados y repeticiones:

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

Donde, n = Número mínimo de muestras, observaciones o réplicas que deben efectuarse en el estudio.

$Z_{\alpha}$  = Valor correspondiente al nivel de confianza asignado (Riesgo de cometer un error tipo I).

$Z_{\beta}$  = Valor correspondiente al poder estadístico o potencia asignada a la prueba (Riesgo de cometer un error tipo II).

W = Rendimiento mínimo esperado, eficiencia mínima esperada o diferencia mínima observable.

Así,  $Z_{\alpha} = 1.96$ ;  $Z_{\beta} = 0.842$ ;  $W = 0.80$  (80%)

Reemplazando la ecuación propuesta se obtuvo que el número mínimo de duplicados fue 9, y en la presente investigación se realizaron 10 duplicados para cada concentración.

### 3.6. Hipótesis :

A mayor concentración de los extractos alcohólicos de *Psidium guajava* “guayaba y de *Medicago sativa* “alfalfa” se observa mayor efecto antibacteriano *in vitro* de sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### 3.7. Variables

### Variables Independientes

Extracto alcohólico de *Psidium guajava*.

Extracto alcohólico de *Medicago sativa*.

### Variable Dependiente:

Efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*.

### 3.8. Operacionalización de Variables

VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSION	VALORES	TIPO DE VARIABLE DE MEDICION	INSTRUMENTO	TÉCNICA
Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i>	halo de inhibición formación de botón	Halo de 15 – 25 mm efecto bacteriostático Halo > de 25 mm efecto Bactericida  Ausencia de botón=efecto bactericida	Cualitativo	software Leica LAS EZ  Vernier	método de microdilución método del disco
VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSION	INDICADOR	TIPO DE VARIABLE	INSTRUMENTO DE MEDICION	TECNICA
extracto de <i>Psidium guajava</i>	concentraciones en mg/ml	grado de absorbancia espectrofotométrica	Cuantitativo	Espectrofotómetro	Espectrofotometría
extracto de <i>Psidium guajava</i>	concentraciones en mg/ml	grado de absorbancia espectrofotométrica	Cuantitativo	Espectrofotómetro	Espectrofotometría

### 3.9. Método, técnicas e instrumentos de recolección de datos

#### 3.9.1. Obtención del extracto alcohólico de *Psidium guajava* “guayaba” y *Medicago sativa* “alfalfa”

La metodología de extracción del extracto consistió en lo siguiente. Las hojas de *Psidium guajava* fueron lavadas con agua y desinfectadas con alcohol de 70° y secadas por 4 horas en estufa a 50 °C. Posteriormente fueron molidas en un molino manual y se colocó en un frasco de vidrio de color ámbar a razón de 250g de material triturado por

cada 1000 mL, de etanol absoluto dejándose macerar por una semana, agitándolo todos los días.

El producto se filtró 3 veces, primero con papel filtro Whatman N° 41, un segundo filtrado fue realizado con papel filtro Whatman, N° 2 y por ultimo un tercer filtrado fue en papel Whatman N° 1. El sobrenadante filtrado se colocó en un Rotavapor con el cual se eliminó el solvente y se obtuvo el extracto que fue secado y pesado y a partir del cual se preparó concentraciones de 1mg/ml, 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 6mg/ml, 7mg/ml, 8mg/ml, 9mg/ml, 10mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14mg/ml, 15 mg/ml, 16mg/ml, 17 mg/ml, 18mg/ml, 19mg/ml y 20mg/ml las que se utilizaron inmediatamente después de preparar. El mismo método fue utilizado para la *Medicago sativa* “alfalfa”. Evaluar.

### **3.9.2. Obtención del cultivo puro *Streptococcus mutans* ATCC 25175** El

cultivo puro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, lo proporciono el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo y fue confirmada fenotípicamente en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional de Lambayeque mediante el sistema automatizado *Microscan*.

### **3.9.3. Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175** Dicha

cepa se reactivó en placas Petri con Agar Sangre (se utilizó agar base sangre de Merck, al cual se le incorporó 5% de sangre de carnero desfibrinada). Las placas con *S. mutans* se incubaron a 37 °C en Jarra

Gaspak (para generar las condiciones de anaerobiosis) en una estufa de Laboratorio. Para la conservación de las cepas hasta la finalización de todas las repeticiones *S. mutans* se replicó en tubos de ensayo con agar gar Mitis Salivarius (MS).

#### **3.9.4. Preparación de medios de cultivo**

Los medios de cultivo a utilizar fueron, Agar Mueller Hinton según MERCK y caldo Mueller Hinton según MERCK, el primero para el recuento de UFC y el segundo para realizar la suspensión bacteriana a evaluar y para determinar la CMI. Se prepararon siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **3.9.5. Preparación y Estandarización del Inoculo**

Se realizó siguiendo el método descrito por Al – Delaimy, en 1970 que utiliza la técnica turbimétrica (nefelómetro de MacFarland) A partir del cultivo puro de 18 horas de *Streptococcus mutans*, se seleccionaron 3 colonias bien aisladas de igual morfología y se preparó una suspensión en 5 mL de agua destilada estéril.

Se buscó alcanzar la concentración semejante a la escala 0,5 del Nefelómetro de MacFarland que corresponde aproximadamente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Para verificar la turbidez adecuada se usó un espectrofotómetro marca UNICO S2100 UV+, donde la absorbancia a 625 nm fue de 0,09 (el método establecía que debería encontrarse entre 0,08 - 0,10 que es lo recomendado). El inóculo preparado se utilizó dentro de los 15 minutos siguientes como recomienda el método.

### 3.9.6. Preparaciones de las Concentraciones del extracto alcohólico de

#### ***Psidium guajava* y *Medicago sativa***

Obtenido el extracto alcohólico seco de *Psidium guajava* y *Medicago sativa*, éste se pesó y disolvió en la misma solución utilizada para la extracción con el que se obtuvo la concentración a evaluar siguiendo la presente fórmula.

$$\text{Mg de soluto} \times \text{ml de solución solvente} = \text{Concentración mg/ml}$$

### 3.9.7. Prueba de susceptibilidad Antibacteriana

La prueba de susceptibilidad antibacteriana se realizó mediante el método de recuento de UFC en placa, y el método de difusión en disco.

En la primera para determinar la CMI y CMB y en la segunda para medir el diámetro de los halos de inhibición. Ambos métodos son recomendados por el CLSI (*Clinical and laboratory Standards institute*) para la determinación de la susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos.

### 3.9.8. Determinación de la CMI y la CMB mediante el Test de

#### **Microdilución en caldo.**

La técnica de microdilución en caldo se empleó para medir en forma cuantitativa la actividad *in vitro* de un agente antimicrobiano contra una bacteria. Para la determinación, se preparó cuatro microplacas a las cuales se le incorporará 100 µl de caldo Mueller-Hinton a cada pocillo. Posteriormente se le agregaron varias concentraciones del agente

antimicrobiano a probar, que para nuestro caso será el extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* en concentraciones volumétricas de 1mg/ml, 2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 6mg/ml, 7mg/ml, 8mg/ml, 9mg/ml, 10mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14mg/ml, 15 mg/ml, 16mg/ml, 17 mg/ml, 18mg/ml, 19mg/ml y 20mg/ml.

La preparación se realizó primero en tubos de ensayo estériles a los que se les adicionará 50 µl de suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans*. Inmediatamente después se realizó la mezcla de los sistemas con ayuda de una micropipeta de rango variable.

La concentración bacteriana final en cada evaluación fue de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Realizada la inoculación se procedió a incubar las microplacas durante 24 horas a 36 °C en condiciones de anaerobiosis, después de lo cual se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos. La microplaca utilizada fue de 96 pozos con fondo en U y esterilizada mediante radiación UV en cámara de bioseguridad Nivel II.

#### **3.9.9. Test de difusión por discos**

A partir del cultivo de 24 horas de *S. mutans*, se seleccionó 2 colonias bien aisladas de igual morfología y se preparará una suspensión en 5 ml de solución salina fisiológica estéril. Esta suspensión obtuvo una turbidez comparable con la escala 0,5 de Mc Farland que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, la cual se verificó usando un espectrofotómetro UV –VISIBLE marca UNICO<sup>25</sup>.

Después de 15 minutos de haber preparado el inóculo se sembró con un hisopo estéril en placas con agar Mueller Hinton (MERCK). Para ello se introdujo un hisopo en el tubo donde se preparará la suspensión bacteriana, se humedeció y luego se presionó el hisopo contra las paredes del tubo a fin de escurrir el exceso de líquido, inmediatamente después se inoculó la superficie seca del agar Mueller Hinton por hisopado en tres direcciones con lo que se asegura una completa distribución de las bacterias.

Posteriormente a la inoculación, después de 10 minutos de secar las placas en la estufa a 37 °C, se colocó discos de papel de filtro en la superficie de los agares con ayuda de una pinza estéril. Dichos discos tenían una dimensión de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se incorporará 25 µL de los dos extractos. Se dejó reposar por 30 minutos y después las placas fueron llevadas a incubación a 37 °C por 24 horas, transcurrido ese tiempo se procedió a examinar cada placa, midiendo con un vernier los diámetros de las zonas (halos) de inhibición.

#### **3.9.10. Lectura de Resultados**

Los resultados se obtuvieron mediante la formación de los halos de inhibición los cuales fueron medidos en milímetros en las tablas diseñadas para ello y estos a su vez registrados en la ficha de recolección de datos.

#### **3.9.11. Para el Método de Microdilución**

Después del tiempo de incubación de las microplacas, se determinó la mínima concentración de la infusión de los extractos alcohólicos que permitió el desarrollo de *Streptococcus mutans*. La concentración siguiente, en la cual ya no se observó el desarrollo bacteriano, se determinó como la CIM y aquella concentración a la cual después de repicar en una placa con agar Mueller Hinton no mostro desarrollo bacteriano fue considerada como la CMB. (La presencia de botón en el fondo del pocillo de la microplaca indico crecimiento bacteriano).

#### **3.9.12. Para el Método de Difusión en Disco**

Se realizó la medición de los halos de inhibición bacteriana de los discos con la concentración del extracto evaluado. Dichos datos se colocaron en tablas diseñadas para ello, que luego se compararon con los halos del control positivo.

#### **3.9.13. Recolección de Datos**

Se realizó el recuento directo de las UFC crecidas en las placas y se midieron los halos de inhibición de los ensayos según método utilizado. Dichos datos se registraron en un formato diseñado para este fin (Anexo I).

#### **3.9.14. Análisis de resultados**

Para el análisis de datos se hizo uso el Software SPSS V20. Y se estableció si hubo diferencias de los halos de inhibición por

extracto evaluado. Se aplicó un ANOVA (análisis de varianza) y un análisis de significancia entre los controles y los ensayos problema, a fin de evaluar las diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

### **3.9.15. Expresión de Resultados**

Los resultados se expresaron en tablas y figuras.

### **3.10. Criterios Éticos**

Los cultivos bacterianos utilizados en la presente investigación fueron esterilizados en autoclave (método físico de eliminación de microorganismos) antes de ser eliminados como residuos biocontaminados, a fin de salvaguardar la integridad de todas las personas que entren en contacto con dichos residuos.

### **3.11. Criterios de Rigor Científico**

La presente investigación se desarrolló aplicando la metodología estandarizada del Clinical y Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>32-34</sup> institución responsable de normar las metodologías para la evaluación de cualquier producto con actividad antimicrobiana como fueron las sustancias utilizadas en la presente tesis, y para asegurar la precisión y confiabilidad de los resultados, se realizaron 10 duplicados por cada concentración de los extractos utilizados y 4 repeticiones de la investigación. En el aspecto operativo de la metodología, este fue

desarrollado por un microbiólogo especialista, quien aseguro la fiabilidad de los resultados y de la metodología. Se creyó conveniente colocar una declaración jurada de la aplicación del método estandarizado con el asesor especialista (anexo 16).

## **CAPÍTULO IV. ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS**

### **4.1. Resultados en tablas y gráficos.**

Los resultados obtenidos en la presente investigación demuestran que el *Streptococcus mutans* fue sensible a las diferentes concentraciones de extracto alcohólico de concentraciones de *Psidium guajava*. En la figura 1 se puede observar que los mayores halos de inhibición se obtienen las concentraciones de 18 mg/ml y 20 mg/ml de extracto

alcohólico de *Psidium guajava* superando al control positivo gluconato de clorhexidina al 0.12% en 17%.

En la figura 2 se puede observar que el *Streptococcus mutans* fue sensible a las diferentes concentraciones de extracto alcohólico de concentraciones de *Medicago sativa* pues se pueden observar halos de inhibición formados, pero esta aparente inhibición no es real debido a que solo dos concentraciones lograron superar al control negativo (etanol absoluto) y ninguna concentración al control positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%).

La figura 3 es una representación de la comparación de los promedios de diámetros de halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 10 concentraciones volumétricas del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* comparándolo con los halos obtenidos en el control positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol absoluto). Se puede apreciar únicamente inhibición de *Streptococcus mutans* por parte de las diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava*.

En la figura 4 es una representación de la comparación de los promedios de diámetros de halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a la concentración de mayor eficiencia del extracto de *Psidium guajava* que fue 18 mg/ml, la de *Medicago sativa* que fue 9 mg/ml, de la sinergia que fue la mezcla de ambas concentraciones y de los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control

negativo (etanol absoluto). Se pudo apreciar que no existe efecto sinérgico inhibitorio sobre *Streptococcus mutans* de los dos extractos evaluados y por el contrario se aprecia un efecto antagónico.

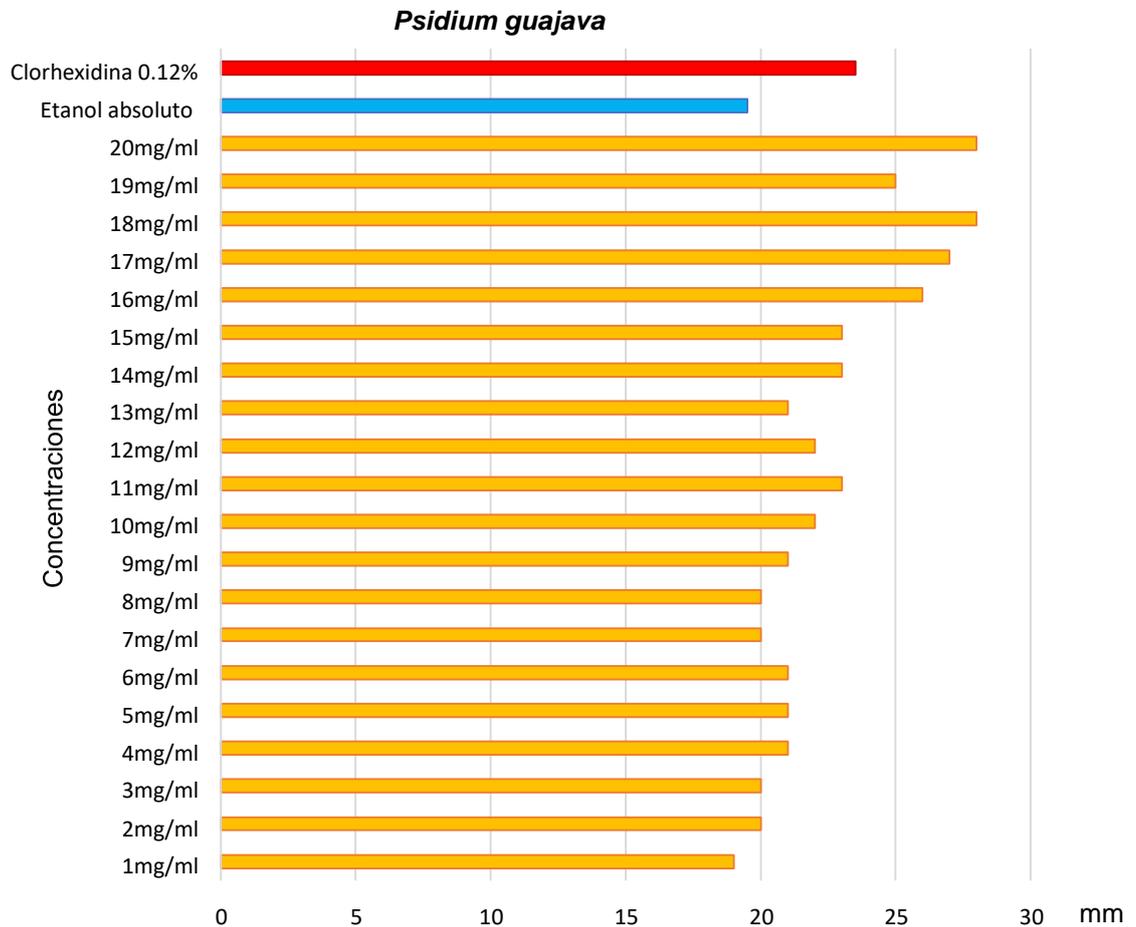


Figura. 1. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 20 concentraciones volumétricas del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol absoluto).

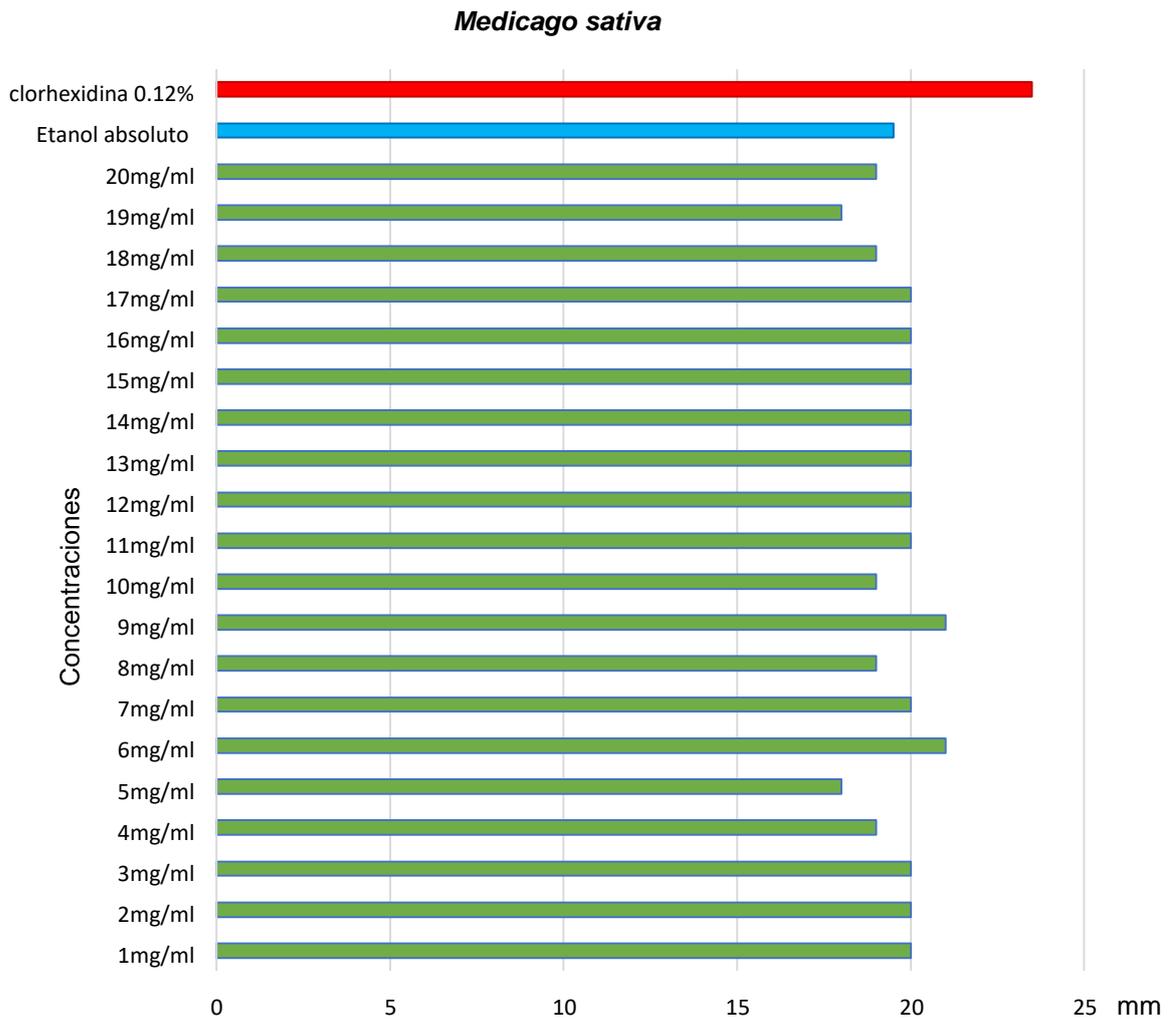


Figura. 2. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 20 concentraciones volumétricas del extracto alcohólico de *Medicago sativa* y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol absoluto).

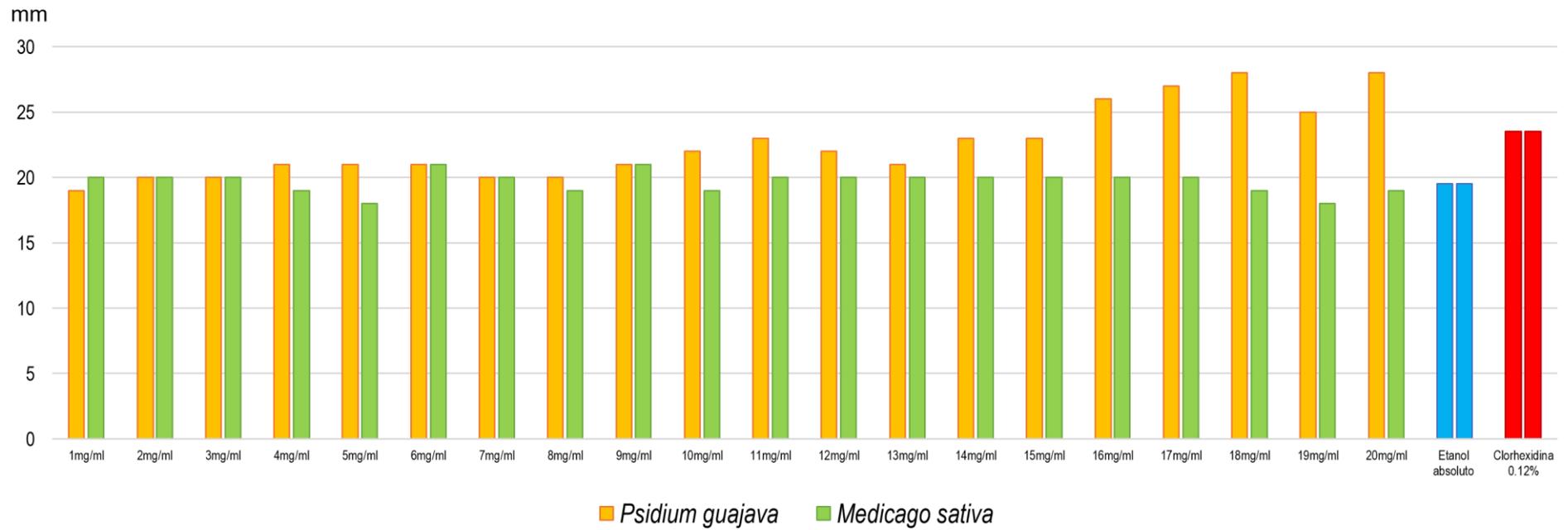


Figura.3. Promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 20 concentraciones volumétricas del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y de *Medicago sativa* y su comparación con los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol absoluto).



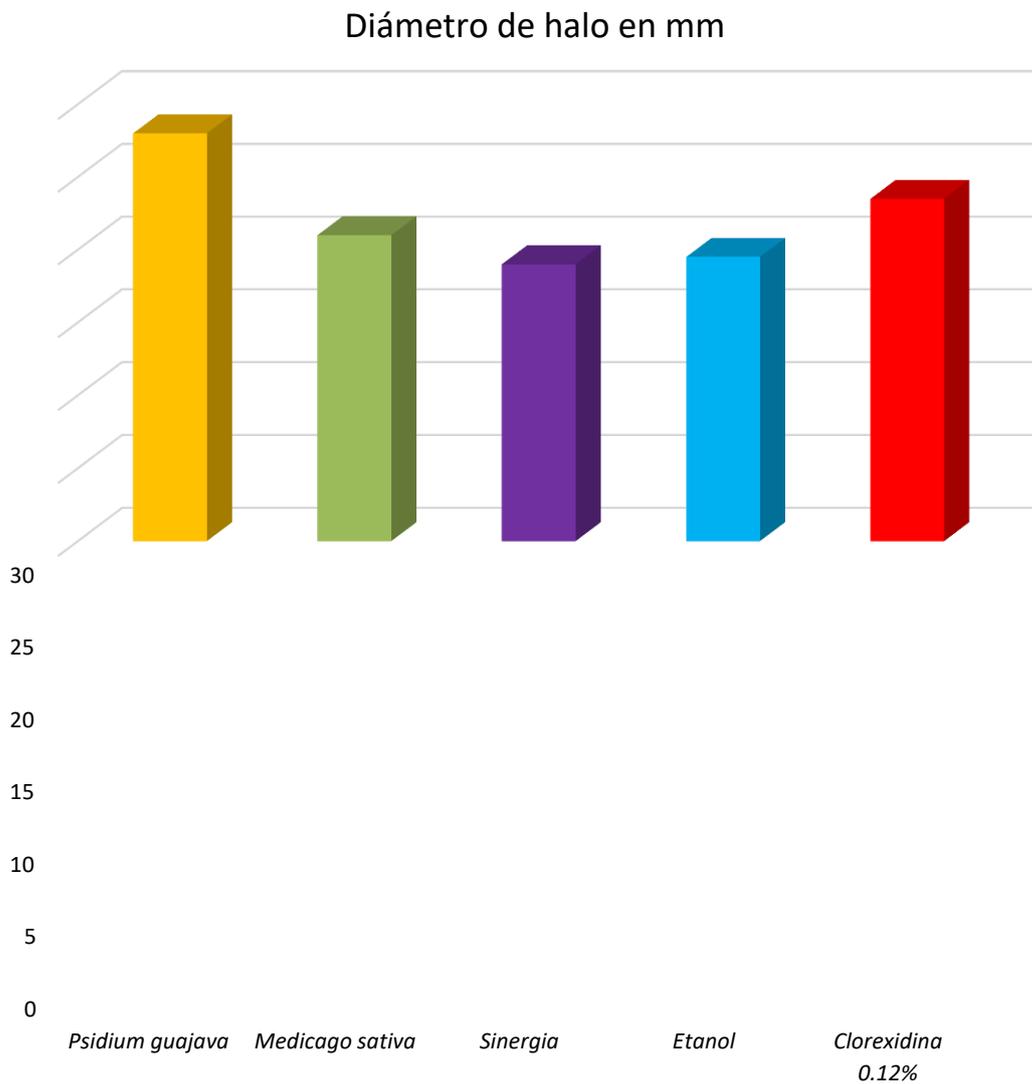


Figura.4. Comparación de los promedios de diámetros de halos de inhibición en milímetros del crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a la concentración de mayor eficiencia del extracto de *Psidium guajava*, de *Medicago sativa*, de la sinergia y de los controles positivo (gluconato de clorhexidina al 0.12%) y el control negativo (etanol absoluto).

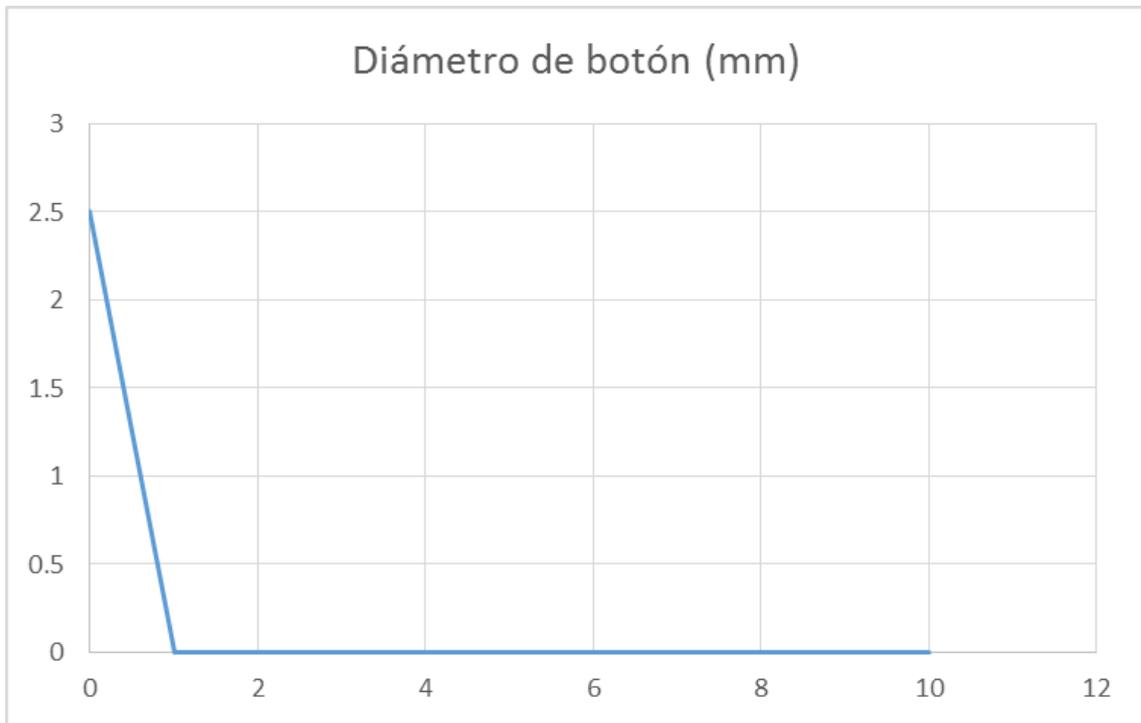


Figura.5. curva de crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 20 concentraciones del extracto alcohólico de *Psidium guajava* mediante el método de microdilución.



Figura.6. curva de crecimiento de *Streptococcus mutans* frente a 20 concentraciones del extracto alcohólico de *Medicago sativa* mediante el método de microdilución.

## 4.2. Discusión de resultados

En esta investigación se propuso determinar efecto antibacteriano *in vitro* del extracto alcohólico de *Psidium guajava* y *Medicago sativa* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 bacteria responsable del inicio y progresión de la caries.

La especie vegetal *Psidium guajava* L., conocida popularmente como “guayaba”, familia Myrtaceae, se ha utilizado tradicionalmente como antidiarreico y para los cólicos intestinales<sup>29</sup>. A pesar de ser una planta reconocida por su bondades farmacológicas no son muchos los estudios que se le han realizado para evaluar las actividades que le confiere el uso etnobotánico. Se ha reportado actividad antibacteriana de amplio espectro para el extracto de las hojas. Comparando los extractos acuosos, alcohólicos y cetónicos de las hojas, frente a veinte cepas de bacterias de interés clínico. El extracto acuoso mostró actividad en el 35% de los casos, el alcohólico en un 65% y el cetónico en el 100% de los casos<sup>31</sup>.

Shital Ch.et al. 2015 evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de varios extractos de hojas de *Medicago sativa* contra varias bacterias importancia clínica humana. La actividad antimicrobiana fue evaluada por el método de difusión en y los resultados demostraron que el extracto metanólico de las hojas *Medicago sativa* tenía actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas<sup>5</sup>. Estos resultados tienen relación con los obtenidos en la presente investigación, porque se logró determinar que el extracto alcohólico de *Medicago sativa* produjo efecto tipo bactericida sobre *Streptococcus mutans*. Esto se pudo

comprobar por la formación de halos de inhibición formados alrededor de los discos con las diferentes concentraciones del extracto. Cabe indicar que a pesar que se observa inhibición esta no logró superar a la sustancia utilizada como control positivo que fue el gluconato de clorhexidina al 0.12%.

iswas .et, durante el 2013 y Nelce M.et al en el 2014 evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de guayaba (*Psidium guajava* L.) Utilizaron el método de difusión en agar. Los resultados mostraron que la inhibición bacteriana sobre microorganismos Gram positivos se debió a la presencia de taninos, sustancia que le otorga una coloración oscura al extracto y es un principio activo presente en las hojas<sup>4</sup>. Estos resultados muestran relación directa con la presente investigación, principalmente porque *Streptococcus mutans* es una bacteria Gram positiva, en segundo lugar porque los halos de inhibición obtenidos con las diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* fueron los de mayor diámetro, superando en un 10% aproximadamente al obtenido con el control gluconato de clorhexidina al 0.12%.

## V. PROPUESTA DE INVESTIGACION

Consideramos continuar la presente investigación con las siguientes propuestas de investigación:

1. Realizar la separación cromatografía del aceite esencial de *Psidium guajava* para determinar cuál de sus componentes es el que tiene efecto bactericida.
2. Realizar investigación del efecto del extracto de *Psidium guajava* en cultivos celulares y/o modelos animales para evaluar su grado de toxicidad.
3. Elaborar productos de uso dental como colutorios a base de extracto de *Psidium guajava* para controlar la placa bacteriana y la halitosis.

## **VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **6.1. Conclusiones**

Los extractos alcohólico de *Psidium guajava* y de *Medicago sativa* tienen efecto bactericida *in vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, el cual fue determinado mediante los métodos de difusión en disco, y el método de microdilución.

El efecto del extracto alcohólico de las hojas de *Psidium guajava* “guayaba” sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es de tipo bactericida a la concentración de 18 mg/ml. El cual superó al control positivo que fue Gluconato de clorhexidina al 0.12%.

El efecto del extracto alcohólico de las hojas de *Medicago sativa* “alfalfa” sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 es bactericida a la concentración de 9 mg/ml. Sin embargo no es significativa con respecto a efecto obtenido por el Gluconato de clorhexidina al 0.12%.

No existe sinergia entre la mezcla de los extractos alcohólicos de *Medicago sativa* “alfalfa” y *Psidium guajava* “guayaba” sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 cuyos resultados no fueron significantes con respecto al control negativo (etanol absoluto).

## 6.2. Recomendaciones

Se recomienda realizar investigación utilizando la planta *Psidium guajava* “guayaba” pero con otros métodos de extracción de principios activos y

continuar los estudios *in vivo*, tanto en cultivo celular como en animales de experimentación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miñana, V. (2011). Promoción de la salud bucodental: *Pediatr Aten Primaria*, 13 (51).

2. Cabezas s César, et al plantas medicinales y el desarrollo nacional. Bol - Inst Nac Salud .2012; (18): 7-8.
3. Nelce M, Mahendradatta M, Laga A, Djide N. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From *Guajava L*) On Pathogens Microbial . international journal of scientific & technology guava leaves (*psidium research* 2014 (3).
4. Bipul B, Kimberly R, Fredrick M, Dwayne D, Anand Y. Antimicrobial Activities of Leaf Extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on Two GramNegative and Gram-Positive Bacteria.. 2013) .
5. Charles O.E., Anthony A.A., Kwaliafon S.M., Nneka N.I., ,Kennedy F.Ch. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* Linn. stem extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. African Journal of Biotechnology. 2012, 11(89):15556-15559.
6. Aliahmadi, A., Roghanian, R., Emtiazi,G., Ghassempour A. A simple method for primary screening of antibacterial peptides in plant seeds. Iran J Microbiol. 2011, (2): 104–108.
7. Doss A., Parivuguna V., Vijayasanthi M., Sruthi S. Antibacterial evaluation and phytochemical analysis of *Medicago sativa* L. against some microbial Pathogens. Indian Journal of Science and Technology. 2011. 4 (5) ISSN: 0974- 6846.
8. Shital Ch, Ravindra S, Kavita S, Vishal B. Evaluation of Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of *Medicago sativa* Leaves.2015(3).
9. Shao, M,et al.Four new triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. J Asian Nat Prod Res. 2012; 14(4):348-54.
10. Xavier L, et al. Intestinal anti-spasmodic effect of a *phytodrug* of *Psidium guajava folia* in the treatment of acute diarrheic disease. Journal of

- Ethnopharmacology. 2002 (83):19–24.
11. Zoe, L.R.,Marta, G.P. LA Alfalfa: Un Remineralizante De Excelencia En El Mundo Vegetal Medisan. 2003;7(4):2-6.
  12. Ross A, Philip W, Holbrook P. Microbiología bucal y clínica. Primera Edición, México, Editorial Científica PLM, S.A. C.V., 1985.
  13. Negroni M. Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica. ed. Buenos Aires – Argentina: Panamericana. 2009:225-245.
  14. Bordoni N, Escobar A, Castillo R. Odontología Pediátrica. La salud bucal del niño y el adolescente en el mundo actual. Ed. Médica Panamericana, 2010.
  15. Liébana J. Microbiología oral. Interamericana, McGraw-Hill, 1995
  16. Liébana J. Microbiología oral. 2da ed. Barcelona – España: Mc GRAW – HILL Interamericana. 2002: 515 - 523.
  17. Nolte, W., Microbiología Odontológica. 4ta ed. México: Nueva Editorial Interamericana, 1996.
  18. Nauntofte B, Tenevuo J, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E. Eds. Dental Caries; The disease and its clinical management. Oxford. Blackwell Munksgard. 2003: 7- 29.
  19. Tenovuo J. Antimicrobial agents in saliva – protection for the whole body. J Dent Research. 2002; 81(12): 807-809.
  20. Banderas J, Gonzales M, Sanchez M, Millan E, López A. Flujo y concentracion de proteinas en saliva total humana. Rev. Salud Pública Mex. 1997; 39(5): 433 441.
  21. Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica,Martha Negroni 2º edición, editorial médica panamericana, Buenos Aires 656 paginas.

22. Microbiología e inmunología evaluación y repaso, Warren Levinson y Ernest Jawetz, editorial el manual moderno México D.F. 1992712 páginas.
23. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología, editorial académica. Sandra Janeth Gutiérrez Prieto 1ª edición editorial pontificia universidad javeriana, 2006 379 paginas
24. Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca, George w. Burnett Henry w. Scherp, George S. Schuster, editorial Limusa México 1986, 942 paginas.
25. Mecanismos de patogenicidad e interacción parásito-hospedero, Rosa del Carmen rocha García, Patricia Lozano Zarain e Ignacio Martínez laguna. Benemérita universidad autónoma de Puebla México 2004 paginas128-142.
26. Actividad cariogénica y su relación con la incidencia de caries. Revista ADM volumen LV, marzo-abril N° 2 paginas 81-85.
27. Real Academia Española, *Diccionario de la lengua española*. 23ª. ed. Madrid: Espasa, 2014.
28. Le Galès-Camus 2004. ARTICULO DE PRENSA. Informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales (consultado el 31-05-2016) disponible en: [www.who.int/mediante/mediacentre/neus/releases\(2004\)pr15/es](http://www.who.int/mediante/mediacentre/neus/releases(2004)pr15/es).
29. Rivera, E; Chavez, M; Gattuso, M; Lozoya X (2003) la hoja de guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales: *revista de fitoterapia*; 3 (2).

30. ESPINOSA-MORENO J, ALOR-CHÁVEZ M d J, CENTURIÓN HIDALGO D, VELÁZQUEZ-MARTÍNEZ J R, MIRANDA-CRUZ E,  
Actividad antimicrobiana de extractos de *Psidium friedrichsthalianum* L.,  
*Pterocarpus hayesii* L., *Tynanthus guatemalensis* L. y *Spondias purpurea*  
L. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y  
Aromáticas 2012;11:354-361. Disponible en:  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85623048007>. Fecha de consulta:  
3 de junio de 2016.
31. Rodríguez, A., Lafourcade, A., Pérez, L. Revista Cubana de Farmacia:  
Hojas de *Psidium guajava*. 2013; 47(1):127-135.
32. CLSI. Performance Standandars for Antimicrobial Susceptibility Testing;  
Twentieth Informational Supplement. USA2010.
33. Mindy J. Perilla. Et al. 2003. Manual de Laboratorio para la Identificación  
y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de  
Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el  
Mundo en Desarrollo. WHO/CDS/CSR/RMD. Disponible  
en:  
[http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO\\_CDS\\_CSR\\_RMD\\_2003\\_6\\_Manual\\_Laboratorio.pdf](http://www.who.int/drugresistance/infosharing/WHO_CDS_CSR_RMD_2003_6_Manual_Laboratorio.pdf).
34. Secretaría Distrital de Salud. Manual de actualización en resistencia  
bacteriana y normas CLSI M100 – S20 2010. GRUPO PARA EL  
CONTROL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA DE BOGOTÁ  
(GREBO). Colombia. Disponible en:

[http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual\\_Resistencia\\_SDS\\_2010.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/SiteCollectionDocuments/Manual_Resistencia_SDS_2010.pdf).

# Anexos



**Anexo 01:** *Medicago sativa* “alfalfa”.



**Anexo 2:** *Psidium guajava* “guayaba”



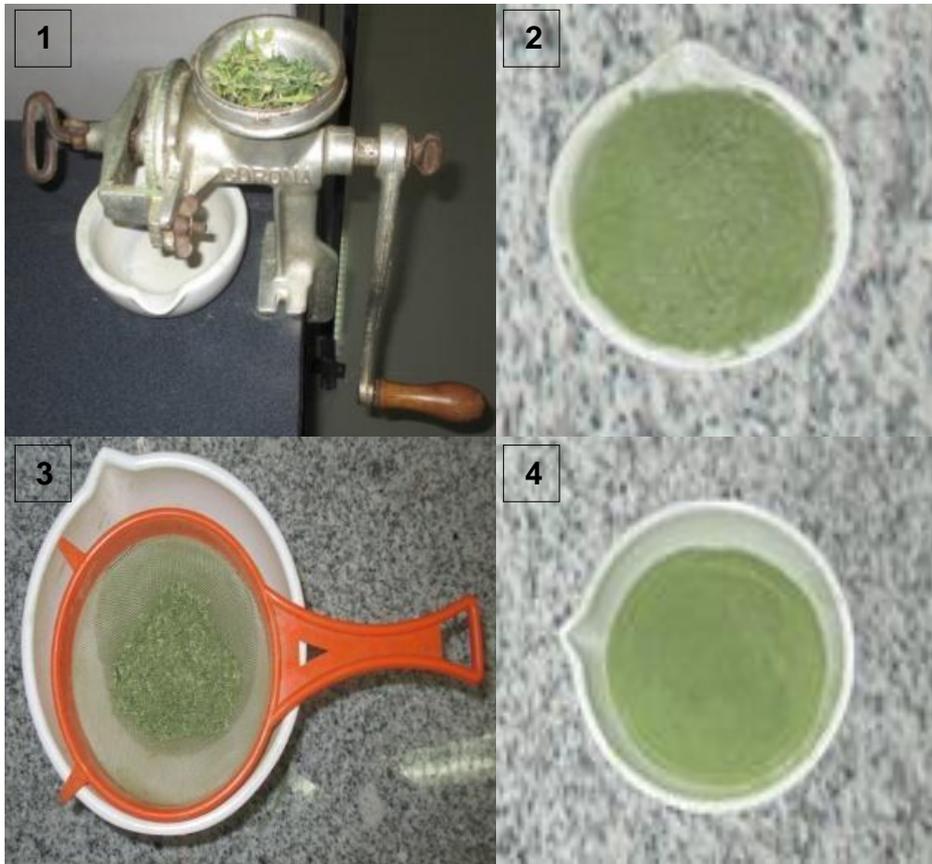
**Anexo 3:** Preparación del material vegetal de *Psidium guajava* “guayaba” y *Medicago sativa* “alfalfa”.

Lavado de las hojas.

Secado de hojas a temperatura ambiente.

Secado de las hojas en horno a 50 °C.

Empaquetado de las hojas completamente secas y listas para moler.



**Anexo 4:** Proceso de molienda del material vegetal proveniente *Medicago sativa* “alfalfa”.

Molienda en molino artesanal.

Alfalfa molida.

Cernido del material vegetal molido.

Material vegetal listo para maceración.



**Anexo 5:** Proceso de molienda del material vegetal proveniente *Psidium guajava* “guayaba”.

Molienda en molino artesanal.

Alfalfa molida.

Cernido del material vegetal molido.

Material vegetal listo para maceración.



**Anexo 6:** Proceso de maceración del material seco de *Psidium guajava* “guayaba” y *Medicago sativa* “alfalfa”.

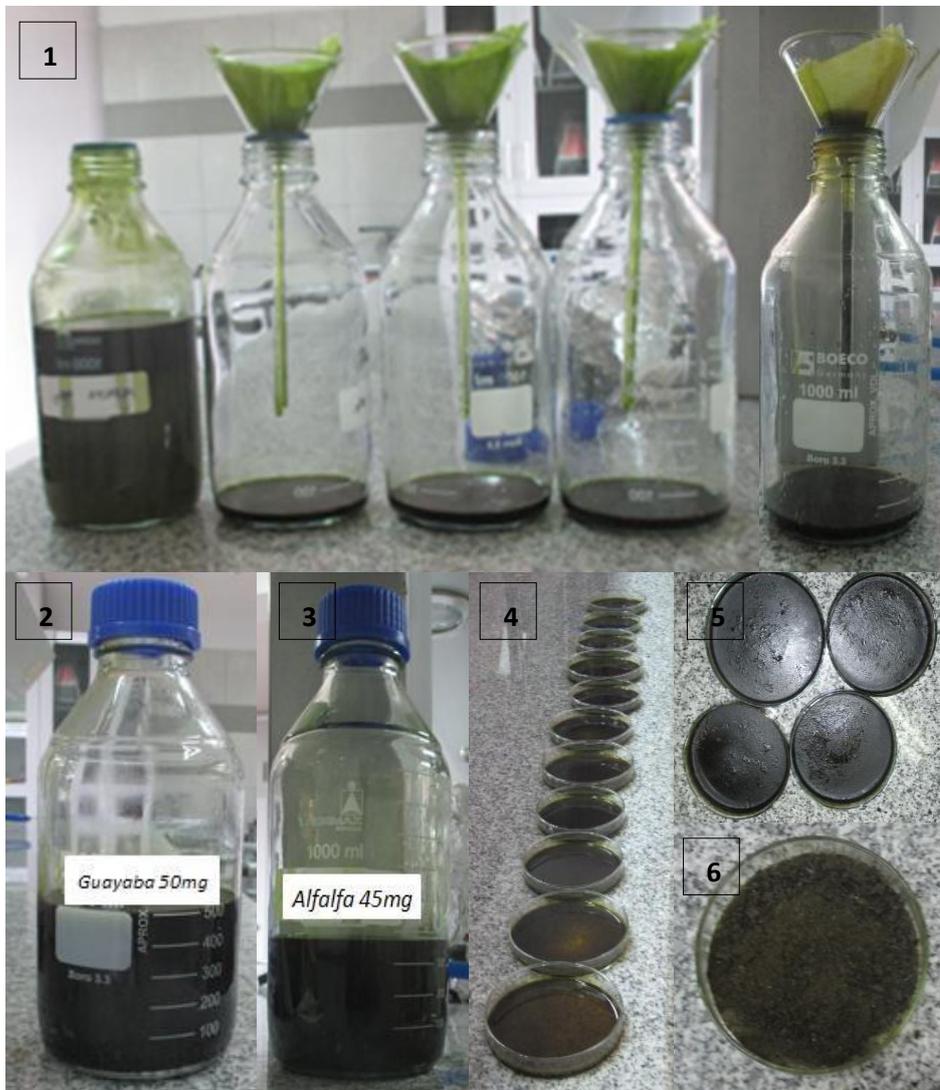
Pesado del material vegetal cernido.

Colocación del material vegetal en el frasco de maceración.

Incorporación de etanol absoluto sobre el material vegetal para maceración.

Material listo para maceración.

Frasco de maceración protegido de la luz solar y en maceración con agitación constante.



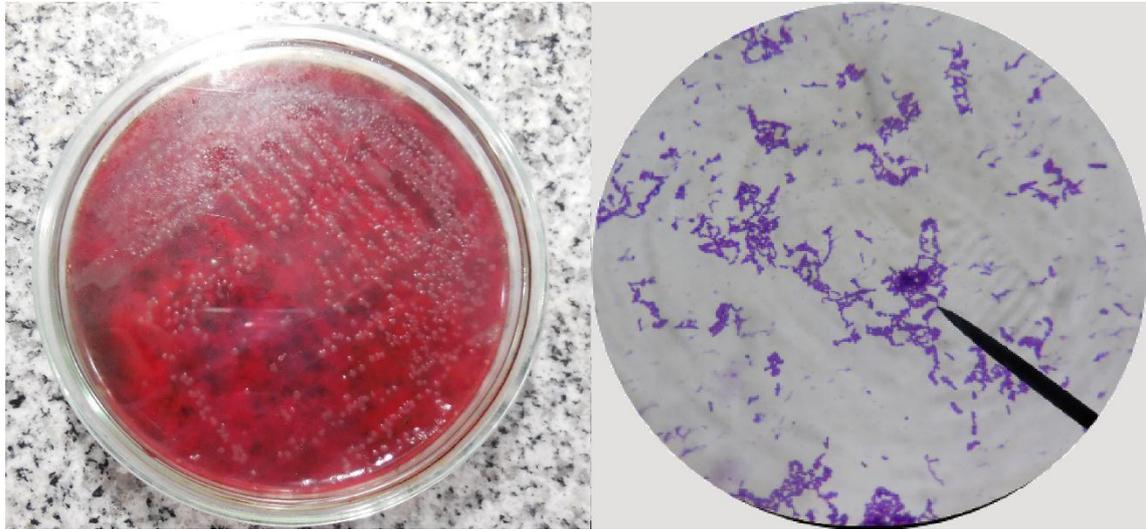
**Anexo 7:** Proceso de obtención del extracto seco de *Psidium guajava* “guayaba” y *Medicago sativa* “alfalfa”.

Filtración del material macerado.

Extracto etanólico de “guayaba”.

Extracto alcohólico de “alfalfa”. Secando a ventilación forzada.

y 6. Extractos secos de *Psidium guajava* “guayaba” y *Medicago sativa* “alfalfa”.



**Anexo 8:** Cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Colonias de *Streptococcus mutans* en medio de cultivo agar sangre al 5%.

Morfología de *Streptococcus mutans* frente a la tinción de gram. Se observan cocos gram positivos en cadena.



**Anexo 9:** Preparación y Estandarización del inóculo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

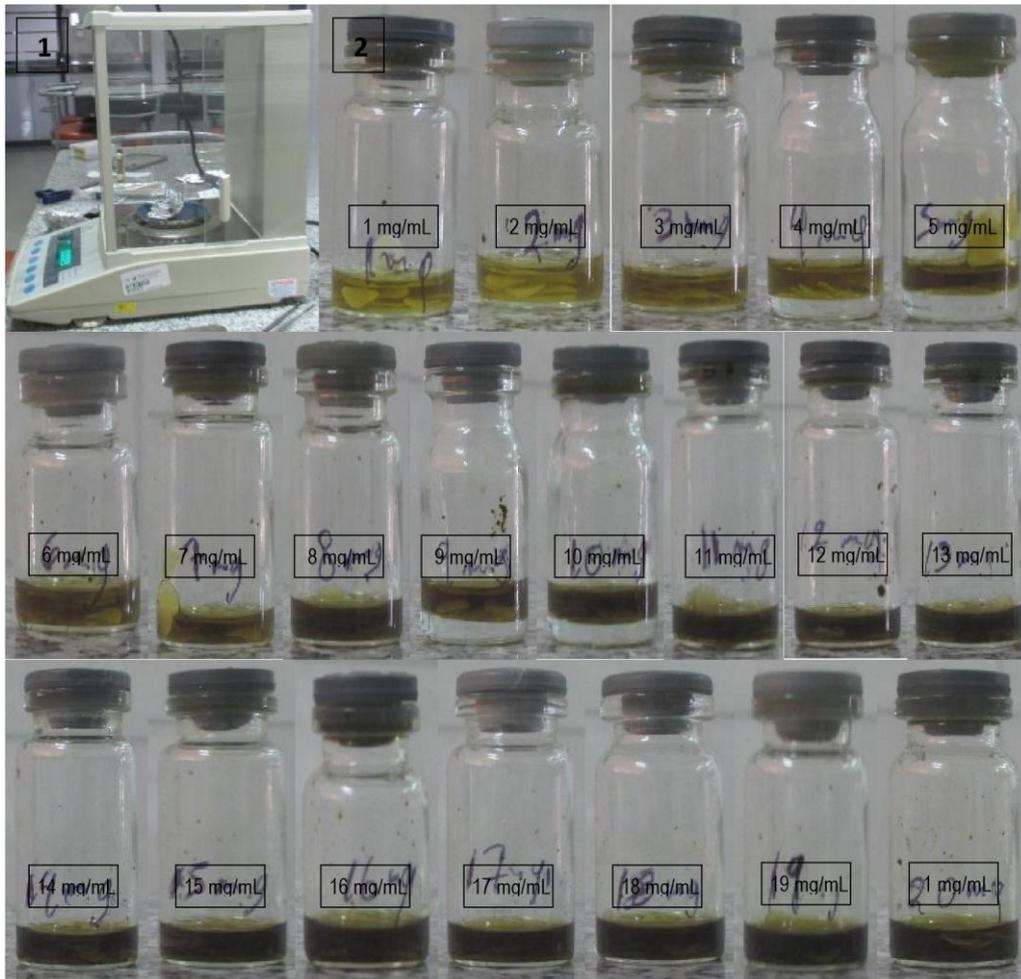
colonias de *Streptococcus mutans* para suspensión.

Preparación de la suspensión bacteriana en tubos con caldo Mueller Hinton. y

4. Estandarización del inóculo en espectrofotómetro.

5. Suspensión de *S. mutans*, estandarizado ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

6. Siembra en superficie del inóculo en placas con agar Mueller Hinton.



**Anexo 10:** Preparación de las diferentes concentraciones del extracto de *Psidium guajava* “guayaba”.

Pesado de extracto seco.

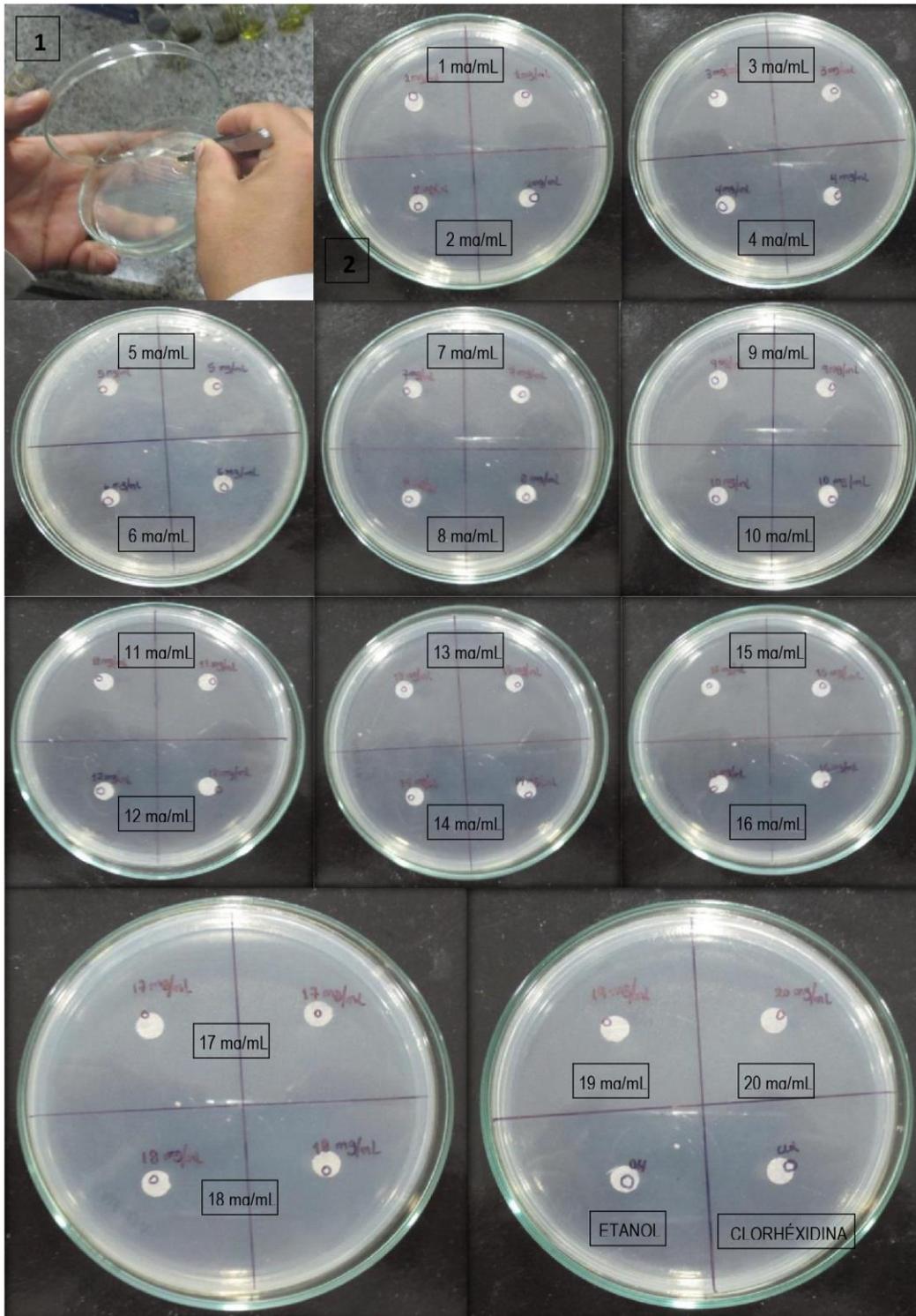
Diferentes concentraciones del extracto alcohólico.



**Anexo 11:** Preparación de las diferentes concentraciones del extracto de *Medicago sativa* “alfalfa”.

Pesado de extracto seco.

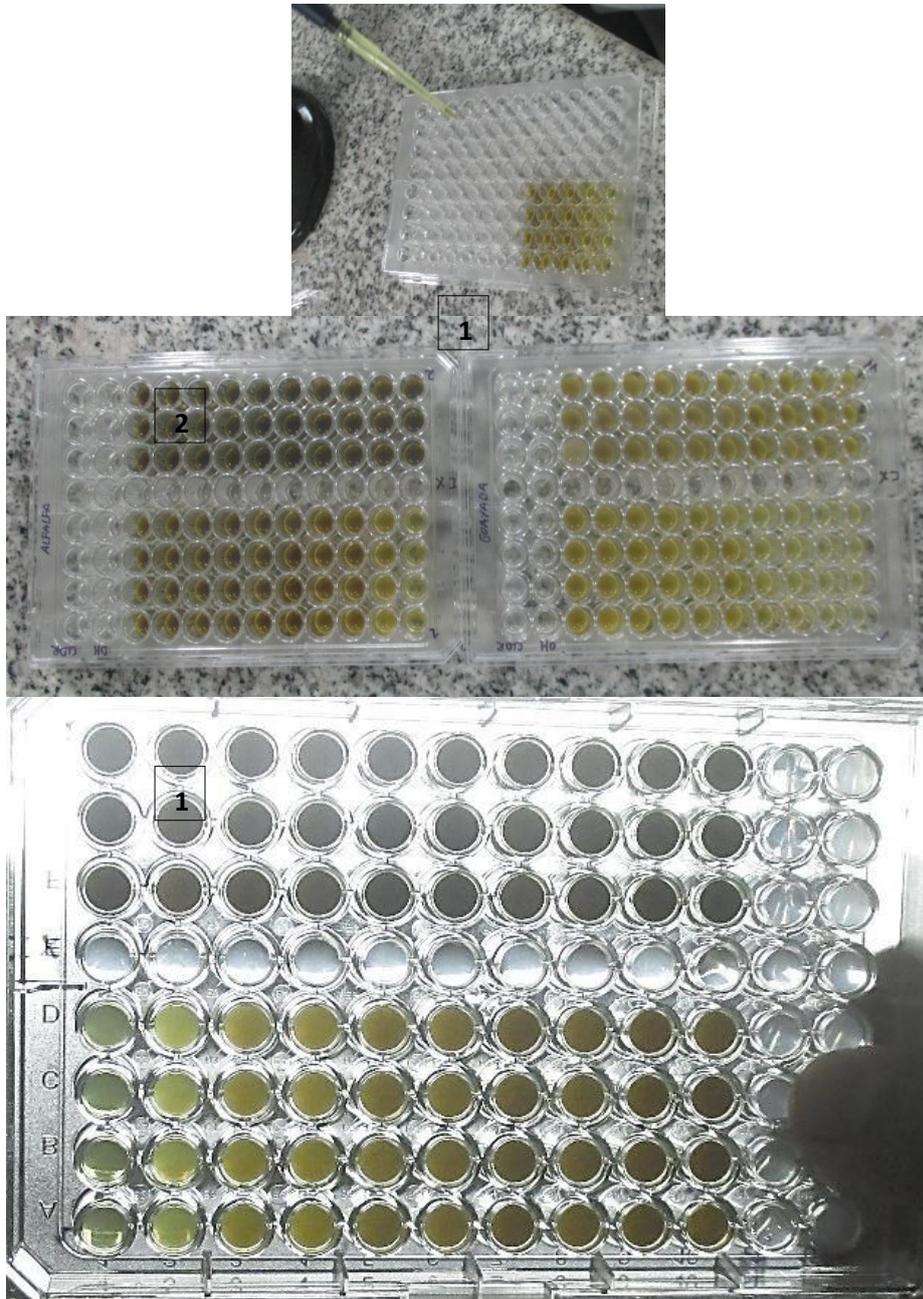
Diferentes concentraciones del extracto alcohólico.



**Anexo 12:** Evaluación por el método de difusión en disco.

Colocación de Discos con extracto alcohólico.

Placas inoculadas listas para incubar.



**Anexo 13:** Evaluación por el método de microdilución.

Inoculación en las microplacas.

y 3. Microplacas inoculadas. Listas para incubar.

**Anexo 14.** Halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans*, por diferentes concentraciones de extracto de *Psidium guajava* .

	GUAYABA			
CONCENTRACIONES	E1	E2	E3	E4

1mg/ml	18.5	19.5	19	19
2mg/ml	19	21	20	20
3mg/ml	20	20	20.5	20
4mg/ml	20	21	21	21
5mg/ml	21	20	21.5	21.5
6mg/ml	21	21	20.5	20.5
7mg/ml	20	19	20	20
8mg/ml	20	20	20	20
9mg/ml	22	20	21	21
10mg/ml	21	21	22	22
11mg/ml	22	23	22.5	22.5
12mg/ml	22	21	21.5	21.5
13mg/ml	21	21	21	21
14mg/ml	21	24	23.5	23.5
15mg/ml	23	23	22	22
16mg/ml	26	25	27.5	27
17mg/ml	26	25	27.5	27.5
18mg/ml	29	27	28.5	28.5
19mg/ml	26	25	25	25
20mg/ml	25	32	28	28

**Anexo 14.** Análisis de varianza de los promedios del diámetro de halos de inhibición de veinte diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Psidium guajava*, sobre *Streptococcus mutans*.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
GUAYABA	20	449	22.45	8.3016447
C-CLOR	20	462.5	23.125	0

ANÁLISIS DE  
VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	4.55625	1	4.55625	1.0976741	0.30139552	4.09817173
Dentro de los grupos	157.73125	38	4.15082237			
Total	162.2875	39				

**Anexo 15.** Halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans*, de espectro extendido por diferentes concentraciones de extracto de *Psidium guajava*.

**Resumen:**

CONCENTRACIONES	ALFALFA			
	E1	E2	E3	E4
1mg/ml	19	20	20	20
2mg/ml	21	20	20	20
3mg/ml	18	20	22	20
4mg/ml	20	19	20	17
5mg/ml	18	18	17	18
6mg/ml	21	21	20	20
7mg/ml	20	20	21	19.5
8mg/ml	19	21	19.5	18
9mg/ml	21	21	21	21.5
10mg/ml	20	20	18	18
11mg/ml	20	20	19	20
12mg/ml	19	20	20	19

13mg/ml	20	20	20.5	19
14mg/ml	19	19	20	20
15mg/ml	19	19	20	20
16mg/ml	20	20	20	20
17mg/ml	20	19.5	20	19
18mg/ml	19	20	18	18
19mg/ml	18	19	17	18
20mg/ml	20	19	19	18

**Anexo 15.** Análisis de varianza de los promedios del diámetro de halos de inhibición de veinte diferentes concentraciones del extracto alcohólico de *Medicago sativa*, sobre *Streptococcus mutans*.

**RESUMEN:**

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
GUAYABA	20	449	22.45	8.3016447
C-CLOR	20	462.5	23.125	0

ANÁLISIS DE  
VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Filas	6.00429688	19	0.31601563	1	0.5	2.1682516
Columnas	130.050391	1	130.050391	411.53152	2.45932E-14	4.38074969
Error	6.00429687	19	0.31601562			
Total	142.058984	39				

## ANEXO 16



USS



UNIVERSIDAD  
SEÑOR DE SIPÁN

### FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ES TOMATOLOGÍA

#### DECLARACIÓN JURADA DE DESARROLLO DE TESIS

Yo, **Miguel Angel Ruiz Barrueto**, identificado con DNI 42814146 y CBP: 8256, Biólogo Microbiólogo de Profesión, declaro bajo juramento haber desarrollado la ejecución de la tesis titulada: **EFFECTO ANTIBACTERIANO In Vitro DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Psidium guajava* y *Medicago sativa* SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175** en lo que respecta a la metodología microbiológica de la investigación con apoyo del Tesista **Diego Armando Chero Nepo**, autor de la tesis mencionada. La metodología utilizada en esta investigación es validada internacionalmente por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) que es la institución que norma y reglamenta los protocolos para la evaluación de agentes antimicrobianos como es el que se evaluó en la presente tesis. Se realizaron duplicados y repeticiones de los ensayos con lo cual se aseguró la fiabilidad de los resultados.

Firmo, sello y coloco mi huella digital en el presente documento en señal de conformidad.

**Mblgo. Miguel Angel Ruiz Barrueto**

**DNI: 42814146**

**CBP: 8256**