



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

“ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA (*in vitro*) DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS
DE ARRAYÁN Y PUMÍN Y SU APLICACIÓN EN UNA PASTA
DENTÍFRICA”

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

PRESENTADO POR:
MARÍA VERÓNICA BODERO POVEDA

RIOBAMBA – ECUADOR
2010

DEDICATORIA

A Dios por caminar a mi lado en el transcurso de toda mi carrera, por ser la luz de mi camino cuando todo estaba oscuro y por darme siempre un mañana para experimentar nuevas enseñanzas.

A la vez quiero agradecer a mis padres Víctor Hugo y Edith; a mis hermanos por haber sido quienes estuvieron cada día apoyándome, demostrándome que con perseverancia, sacrificio y amor todo es posible.

No es importante quienes son las personas que se encuentran a mi alrededor sino que representan en el transcurso de mi vida, a mis profesores, amigos y demás gracias por regalarme un minuto de su tiempo para estar conmigo.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

A la Dra. Susana Abdo y Dra. Janneth Gallegos por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente tesis.

Al Dr. Mario Corrales y al Dr. Francisco Portero por haber sido a más de profesores también amigos; apoyándome con sus acertadas opiniones en la realización de este trabajo.

A Sonia Méndez Y BQF Fausto Contero por sus palabras de apoyo durante toda mi carrera y sobre todo durante esta etapa.

A todas las personas que colaboraron de cualquier manera para la culminación de este trabajo de investigación.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**FACULTAD DE CIENCIAS****ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Tesis certifica que el trabajo de investigación: “ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (*in vitro*) DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN Y SU APLICACIÓN EN UNA PASTA DENTÍFRICA”, de responsabilidad de la señorita egresada María Verónica Boderó Poveda, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Yolanda Días DECANA FAC. CIENCIAS	-----	-----
Dr. Luis Guevara DIRECTOR ESCUELA BIOQUÍMICA Y FARMACIA	-----	-----
Dra. Susana Abdo DIRECTOR DE TESIS	-----	-----
Dra. Janneth Gallegos MIEMBRO DEL TRIBUNAL	-----	-----
Tc. Carlos Rodríguez DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN	-----	-----

NOTA DE TESIS -----

Yo, **María Verónica Boderó Poveda**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenece a la **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**.

MARÍA VERÓNICA BODERO POVEDA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

m	Metro
Km	Kilómetro
Kg	Kilogramo
mm	Milímetro
°C	Grados centígrados
mL	Mililitro
g	Gramos
mg	Miligramos
L	Litro
UV	Ultra violeta
N°	Número
cm	Centímetro
min	Minuto
h	Hora
ST	Sólidos Totales
%C	Porcentaje de Cenizas
OMS	Organización Mundial de la Salud
C	Carbono
H	Hidrogeno
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
S	Sensible
I	Intermedio
R	Resistente
EP	Extracto de Planta
TSA	Agar Soya Tríptica
µm	Micrómetros
DN-asa	Desoxiribonucleasa
RN-asa	Ribonucleasa
SNC	Sistema Nervioso Central
LPS	Lipopolisacáridos
SgA	Subgrupo A
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Infusión Cerebro Corazón
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
NCFE	Normas de Correcta Fabricación de Fórmulas Magistrales y Preparados Oficiales

UFC	Unidades formadoras de colonias
PCA	Agar Plate Count
MHA	Agar Mueller-Hinton
CMC	Carboximetil Celulosa
M1	Residuo del extracto fluido de Pumín (<i>Salvia squalens</i>)
M2	Residuo del extracto fluido de Arrayán (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>)
mgA	Miligramos de Arrayán
mgP	Miligramos de Pumín
R1	Repetición 1
R2	Repetición 2
R3	Repetición 3
R4	Repetición 4
R5	Repetición 5
R6	Repetición 6
R7	Repetición 7
R8	Repetición 8
R9	Repetición 9
[]	Concentración
Rf	Distancia de la sustancia/frente de la fase móvil
Rf1	banda de rf N°1
Rf2	banda de rf N°2
Rf3	banda de rf N°3
Rf4	banda de rf N°4
Rf5	banda de rf N°5
Rf6	banda de rf N°6
R²	coeficiente de correlación
TLC	cromatografía de capa fina
UFC	unidades formadoras de colonias

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	- 5 -
ÍNDICE DE TABLAS	- 12 -
ÍNDICE GRÁFICOS.....	- 17 -
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	- 18 -
ÍNDICE DE ANEXOS.....	- 21 -
INTRODUCCIÓN	- 22 -
CAPÍTULO I.....	- 24 -
1. MARCO TEÓRICO.....	- 24 -
1.1. FITOTERAPIA.....	- 24 -
1.1.1. MEDICINA TRADICIONAL	- 24 -
1.1.1.1. LAS NUEVAS TENDENCIAS DE MEDICAMENTOS EN EL ECUADOR.....	- 25 -
1.1.2. PLANTAS MEDICINALES	- 26 -
1.1.3. TIPOS DE PREPARACIONES FITOTERÁPICAS.....	- 29 -
1.1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES	- 30 -
1.1.3.2. POTENCIA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.....	- 30 -
1.2. ESPECIES VEGETALES	- 31 -
1.2.1. ARRAYÁN (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>).....	- 31 -
1.2.1.1. TAXONOMÍA	- 31 -
1.2.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	- 31 -
1.2.1.3. COMPONENTES IMPORTANTES:	- 32 -
1.2.1.4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.	- 32 -
1.2.1.5. PROPIEDADES MEDICINALES	- 33 -
1.2.2. SALVIA (<i>Salvia spp</i>).....	- 33 -
1.2.2.1. TAXONOMÍA	- 33 -
1.2.2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES	- 34 -

1.2.2.3.	COMPONENTES IMPORTANTES:	- 34 -
1.2.2.4.	ESPECIES:	- 35 -
1.2.2.5.	ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	- 36 -
1.2.2.6.	DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.	- 36 -
1.2.2.7.	PARTES TERAPÉUTICAS:	- 36 -
1.2.2.8.	ACTIVIDAD TERAPÉUTICA:	- 36 -
1.2.2.9.	CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES	- 37 -
1.2.3.	PUMÍN (Salvia squalens)	- 38 -
1.3.	SALUD BUCODENTAL	- 38 -
1.3.1.	MICROBIOLOGÍA BUCAL.....	- 39 -
1.3.2.	PATÓGENOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES... ..	- 40 -
1.3.2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2.2.	<i>Escherichia coli</i>	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2.3.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	¡Error! Marcador no definido.
1.3.2.4.	<i>Candida albicans</i>	- 53 -
1.4.	AGENTES ANTIMICROBIANOS	- 56 -
1.4.1.	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	- 56 -
1.4.2.	SENSIBILIDAD BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	- 57 -
1.4.2.1.	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.....	- 57 -
1.4.2.2.	CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA.....	- 59 -
1.4.2.3.	MECANISMO DE ACCIÓN DE AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	- 60 -
1.4.3.	RESISTENCIA BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	- 61 -
1.4.3.1.	MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS.....	- 62 -
1.4.4.	TOLERANCIA ANTIMICROBIANA	- 63 -
1.4.5.	AGENTE ANTIMICROBIANO DE ORIGEN VEGETAL	- 64 -
1.4.6.	ACTIVIDAD COMBINADA DE ANTIMICROBIANOS.....	- 64 -

1.4.6.1.	INTERACCIONES ENTRE AGENTES ANTIMICROBIANOS ..	- 64 -
1.5.	PRODUCTOS GRAS (Generally recognized as safe)	- 65 -
1.5.1.	DENTÍFRICO.....	- 66 -
CAPÍTULO II		- 67 -
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	- 67 -
2.1.	LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO.....	- 67 -
2.2.	RECURSOS MATERIALES	- 67 -
2.2.1.	MATERIAL VEGETAL Y BIOLÓGICO	- 67 -
2.2.2.	EQUIPOS	- 68 -
2.2.3.	REACTIVOS.....	- 68 -
2.2.4.	MATERIALES DE LABORATORIO.....	- 69 -
2.3.	FACTORES DE ESTUDIO	- 69 -
2.4.	UNIDAD EXPERIMENTAL O DE ANÁLISIS.....	- 69 -
2.5.	METODOLOGÍA	- 70 -
2.5.1.	DROGA VEGETAL CRUDA Y EXTRACTOS FLUIDOS	- 70 -
2.5.1.1.	RECOLECCIÓN DE DROGA VEGETAL.....	- 70 -
2.5.1.2.	PRUEBAS PARA CONTROL DE CALIDAD DE DROGA CRUDA.....	- 70 -
2.5.1.2.1.	ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 70 -
2.5.1.2.2.	ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LAS HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 71 -
2.5.1.2.3.	PROCESAMIENTO DE EXTRACTOS FLUIDOS VEGETALES.....	- 72 -
2.5.2.	RECOLECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS NATIVAS IMPLICADAS EN INFECCIONES PERIODONTALES CONFIRMADAS	- 74 -
2.5.2.1.	RECOLECCION DE MUESTRAS DE SALIVA	- 74 -
2.5.2.2.	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES EN MEDIOS SELECTIVOS.....	- 75 -

2.5.3. PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN	- 75 -
2.5.3.1. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN POR SEPARADO.	- 76 -
2.5.3.2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN COMBINADO.....	- 78 -
2.5.4. INCORPORACIÓN DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN EN LA ELABORACIÓN DE UN DENTÍFRICO	- 79 -
2.5.4.1. CONTROL DE CALIDAD DEL DENTÍFRICO.....	- 80 -
2.6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	- 80 -
2.6.1. TRATAMIENTO DE ACTIVIDAD “ <i>in vitro</i> ”	- 80 -
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	- 81 -
CAPÍTULO III.....	- 82 -
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 82 -
3.1. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE ARRAYAN (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>) Y PUMÍN (<i>Salvia squalens</i>)	- 82 -
3.1.1. CALIDAD DE DROGA CRUDA DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 82 -
3.1.1.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 83 -
3.1.1.2. CONTROL FÍSICO-QUÍMICO DE LAS HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 83 -
3.1.2. CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN	- 85 -
3.1.2.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO	- 86 -
3.1.2.2. CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC) DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN	- 87 -
3.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	- 91 -
3.2.1. CEPAS BACTERIANAS	- 91 -
3.2.1.1. IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DE PATÓGENOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES	- 91 -
3.2.1.2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN POR SEPARADO	- 96 -

3.2.1.2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN COMBINADA.....	- 104 -
3.3. DENTÍFRICO INCORPORADO EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN	- 116 -
3.3.1. CONTROL DE CALIDAD DEL DENTÍFRICO	- 116 -
CONCLUSIONES	- 118 -
RECOMENDACIONES	- 120 -
RESUMEN	- 121 -
SUMMARY	- 122 -
BIBLIOGRAFÍA	- 123 -
ANEXOS.....	- 136 -

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ARRAYÁN (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>).....	- 31 -
TABLA N° 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE SALVIA (<i>Salvia spp</i>).....	- 33 -
TABLA N° 3. CLASIFICACIÓN DE ESPECIES DE SALVIA	- 35 -
TABLA N° 4. MICROBIOTA CULTIVABLE DE LA BOCA	- 40 -
TABLA N°5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	- 42 -
TABLA N°6 PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	- 43 -
TABLA N°7. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Escherichia coli</i>	- 46 -
TABLA N°8. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Streptococcus pyogenes</i>	- 50 -
TABLA N°9. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Candida albicans</i>	- 53 -
TABLA N°10. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CMB	- 59 -
TABLA N°11. FACTORES DE ESTUDIO APLICABLES A ESTA INVESTIGACIÓN....	- 69 -
TABLA N°12: TABLERO DE COMBINACIONES PARA COMBINACIONES	- 78 -
TABLA N°13: FORMULACIÓN DE UN DENTÍFRICO EN FUNCIÓN A SUS PORCENTAJES Y FUNCIÓN	- 79 -
TABLA N°14: TRATAMIENTOS REALIZADOS DE CADA EXTRACTO FLUIDO POR SEPARADO Y EN COMBINACION PARA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA....	- 80 -

TABLA N°15: POCENTAJE DE HUMEDAD CONTENIDO EN LAS HOJA DE ARRAYÁN Y PUMÍN RESPECTIVAMENTE.....	- 83 -
TABLA N°16. DETERMINACION DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN ACIDO CLORHIDRICO DE LA DROGA CRUDA ARRAYAN Y PUMÍN.....	- 84 -
TABLA N°17. DETERMINACIÓN ORGANOLÉPTICA, DENSIDAD RELATIVA, INDICE DE REFRACCIÓN Y pH DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 85 -
TABLA N°18. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA DROGA CRUDA DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 86 -
TABLA N°19: RF DE BANDAS DE ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.	- 89 -
TABLA N°20: RF DE BANDAS DE FLAVONOIDES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.	- 91 -
TABLA N°21: COMPORTAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.....	- 96 -
TABLA N°22: COMPORTAMIENTO DE <i>Staphylococcus aureus</i> AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN -	97 -
TABLA N°23: COMPORTAMIENTO DE <i>Streptococcus pyogenes</i> AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN -	98 -
TABLA N°24: COMPORTAMIENTO DE <i>Candida albicans</i> AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.....	- 99 -
TABLA N°25: COMPORTAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i> ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN	

DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN
.....- 100 -

TABLA N°26: COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN
.....- 100 -

TABLA N°27: COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN
.....- 101 -

TABLA N°28. ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CIM PARA *Staphylococcus aureus* CON LOS DIFERENTES EXTRACTOS ARRAYAN Y PUMÍN...
..... - 102 -

TABLA N°29. COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN..... - 105 -

TABLA N°30: ANÁLISIS DE DIFERENCIAS ENTRE CATEGORIAS TEST DE TUKEY PARA *Staphylococcus aureus* - 106 -

TABLA N°31. COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN..... - 107 -

TABLA N°32: ANÁLISIS DE DIFERENCIAS ENTRE CATEGORIAS TEST DE TUKEY PARA *Escherichia coli* - 108 -

TABLA N°33. COMPORTAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* i AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN..... - 109 -

TABLA N°34 ANÁLISIS DE DIFERENCIAS ENTRE CATEGORIAS TEST DE TUKEY PARA *Streptococcus pyogenes* - 111 -

TABLA N°35. COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN - 112 -

TABLA N°36. COMPORTAMIENTO DE CEPAS ATCC COMO CONTROL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN - 113 -

TABLA N°37. CONTROL DE CALIDAD DE UN DENTIFRICO INCORPORADO EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN - 116 -

TABLA N°38: POCENTAJE DE HUMEDAD CONTENIDO EN LAS HOJA DE ARRAYÁN Y PUMÍN RESPECTIVAMENTE - 136 -

TABLA N°39: COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN - 136 -

TABLA N°40: COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN - 137 -

TABLA N°41: COMPORTAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN - 138 -

TABLA N°42: COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN - 139 -

TABLA N°43: COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN

DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN
.....- 139 -

TABLA N°44: COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* ATCC AISLADO DE UN
POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN
DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN
.....- 140 -

TABLA N°45: COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* ATCC AISLADO DE UN
POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN
DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN
.....- 140 -

TABLA N° 46: RECUENTO DE UFC/INÓCULO - 142 -

TABLA N°47. VALORES DE RECHAZO Y CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y
ESPECIFICIDAD DE CONCENTRACIÓN INICIAL - 142 -

TABLA N°48. COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE UN
POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN
DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE
ARRAYAN Y PUMÍN - 143 -

TABLA N°49. COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* AISLADA DE UN POOL
SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS
IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE
ARRAYAN Y PUMÍN - 144 -

TABLA N°50. COMPORTAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* i AISLADA DE UN
POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN
DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE
ARRAYAN Y PUMÍN - 146 -

TABLA N°51. COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* AISLADA DE UN POOL
SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS
IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE
ARRAYAN Y PUMÍN - 147 -

TABLA N° 52. LISTA DE PÉRFILES NUMÉRICOS api ® Candida. - 150 -

ÍNDICE GRÁFICOS

GRAFICO N°1. CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA ACEITES ESENCIALES DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS	- 88 -
GRAFICO N°2. CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA FLAVONOIDES DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS.....	- 90 -
GRAFICO N°3: DIAMETROS DE ZONAS DE INHIBICION <i>S. aureus</i> vs. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.....	- 105 -
GRAFICO N°4: DIAMETROS DE ZONAS DE INHIBICION <i>E. coli</i> VS. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN.....	- 107 -
GRAFICO N°5: DIÁMETROS DE ZONAS DE INHIBICIÓN <i>S .pyogenes</i> VS. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN.....	- 110 -
GRAFICO N°6: DIAMETROS DE ZONAS DE INHIBICION BACTREIANA VS. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.....	- 114 -

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N° 1. RAMA DE ARRAYAN (<i>Myrcianthes rhopaloides</i>).....	- 31 -
FOTOGRAFIA N°2. Pumín (<i>Salvia squalens</i>).....	- 38 -
FOTOGRAFIA N° 3. Morfología macroscópica <i>Staphylococcus aureus</i>	- 41 -
FOTOGRAFIA N° 4. Morfología microscópica de <i>Staphylococcus aureus</i>	- 41 -
FOTOGRAFIA N°5. Morfología macroscópica de <i>Escherichia coli</i>	- 46 -
FOTOGRAFIA N° 6. Morfología microscópica de <i>Escherichia coli</i>	- 46 -
FOTOGRAFIA N° 7. Morfología macroscópica de <i>Streptococcus pyogenes</i>	- 49 -
FOTOGRAFIA N° 8. Morfología microscópica de <i>Streptococcus pyogenes</i>	- 49 -
FOTOGRAFIA N° 9. Morfología macroscópica de <i>Candida albicans</i>	- 53 -
FOTOGRAFIA N° 10. Morfología microscópica de <i>Candida albicans</i>	- 53 -
FOTOGRAFIA N°11. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de microdilución en caldo de Extracto fluido de Arrayan (A0, A1, A2, A3).....	- 103 -
FOTOGRAFIA N°12. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de microdilución en caldo de Extracto fluido de Pumin (P0, P1, P2, P3).....	- 103 -
FOTOGRAFIA N°13. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de macrodilución en caldo de Extracto fluido Arrayan A4, A5, A6, A7	- 104 -
FOTOGRAFIA N°14. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de macrodilución en caldo de Extracto fluido Pumin A8, A9, A10, A11	- 104 -
FOTOGRAFIA N°15. Ensayo biológico en <i>Staphylococcus aureus</i> frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10 mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente.....	- 137 -

FOTOGRAFIA N°16. Ensayo biológico en <i>Escherichia coli</i> frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10 mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente.....	- 138 -
FOTOGRAFIA N°17. Ensayo biológico en <i>Streptococcus pyogenes</i> frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente.....	- 138 -
FOTOGRAFIA N°18. Ensayo biológico en <i>Candida albicans</i> frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente.....	- 139 -
FOTOGRAFIA N°19. Ensayo biológico en <i>Staphylococcus aureus ATCC</i> frente a Sensidisco de 1000, 100, 10mg/mL de extractos por separado.....	- 140 -
FOTOGRAFIA N°20. Ensayo biológico en <i>Escherichia coli ATCC</i> frente a Sensidisco de 1000, 100, 10mg/mL de extractos por separado.....	- 140 -
FOTOGRAFIA N°21. Ensayo biológico en <i>Candida albicansATCC</i> frente a Sensidisco de 1000, 100, 10mg/mL de extractos por separado.....	- 141 -
FOTOGRAFIA 22. Juego de Frascos de Pumín para prueba de Macrodilución en caldo para CIM después de 24 horas.....	- 141 -
FOTOGRAFIA 23. Juego de Frascos de Arrayan para prueba de Macrodilución en caldo para CIM después de 24 horas.....	- 141 -
FOTOGRAFIA N°24. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:1000 y 1000:750 combinados de extractos frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	- 143 -
FOTOGRAFIA N°25. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:500 y 750:1000 combinados de extractos frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	- 143 -
FOTOGRAFIA N°26. Ensayo biológico de sensidiscos 750:750 y 750:500 combinados de extractos frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	- 144 -
FOTOGRAFIA N°27. Ensayo biológico de sensidiscos 500:1000 y 500:750 combinados de extractos frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	- 144 -
FOTOGRAFIA N°28. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:1000 y 1000:750 combinados de extractos frente a <i>Escherichia coli</i>	- 145 -

FOTOGRAFIA N°29. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:500 y 750:1000 combinados de extractos frente a *Escherichia coli* - 145 -

FOTOGRAFIA N°30. Ensayo biológico de sensidiscos 750:750 y 750:500 combinados de extractos frente a *Escherichia coli*..... - 145 -

FOTOGRAFIA N°31. Ensayo biológico de sensidiscos 500:1000 y 500:750 combinados de extractos frente a *Escherichia coli*..... - 145 -

FOTOGRAFIA N°32. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:1000 y 1000:750 combinados de extractos frente a *Streptococcus pyogenes*..... - 146 -

FOTOGRAFIA N°33. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:500 y 750:1000 combinados de extractos frente a *Streptococcus pyogenes*..... - 146 -

FOTOGRAFIA N°34. Ensayo biológico de sensidiscos 750:750 y 750:500 combinados de extractos frente a *Streptococcus pyogenes*..... - 147 -

FOTOGRAFIA N°35. Ensayo biológico de sensidiscos 500:1000 y 500:750 combinados de extractos frente a *Streptococcus pyogenes*..... - 147 -

FOTOGRAFIA N°36. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Candida albicans*ATCC - 148 -

FOTOGRAFIA N°37. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC - 148 -

FOTOGRAFIA N°38. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus*ATCC..... - 148 -

FOTOGRAFIA N°39. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Escherichia coli* ATCC..... - 149 -

FOTOGRAFIA N°40. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Escherichia coli* ATCC..... - 149 -

FOTOGRAFIA N°41. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Candida albicans*ATCC - 149 -

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1. CONTENIDO DE HUMEDAD POR TRIPLICADO DE HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN.....	- 136 -
ANEXO N° 2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN POR SEPARADO POR METODO DE DIFUSION EN DISCO DE CONCENTRACIÓN DE 1000mg/mL, 100mg/mL Y DE 10mg/mL FRENTE A MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES CONFIRMADAS.	- 136 -
ANEXO N°3. MACRODILUCION EN CALDO CON EXTRACTO FLUIDO DE ARRAYAN Y PUMÍN PARA CMI Y CMB.....	- 141 -
ANEXO N°4. TABLA DE RECHAZOS PARA CMB Y CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE CONCENTRACIÓN INICIAL.....	- 142 -
ANEXO N° 5. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN COMBINADOS POR METODO DE DIFUSION EN DISCO DE CONCENTRACIÓN DE 1000mg/mL, 100mg/mL Y DE 10mg/mL FRENTE A MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES CONFIRMADAS.	- 143 -
ANEXO N° 6. LISTA DE PERFILES NUMÉRICOS api ® Candida	- 150 -

INTRODUCCIÓN

Las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades contenidas en ellas, en aras de buscar nuevas alternativas vegetales, se ha incrementado el estudio de sus componentes para reconocer aquellas beneficiosas para la higiene bucal, gracias a la diversidad de especies vegetales en Ecuador.

Se eligió ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*) y PUMÍN (*Salvia squalens*), su selección se basó en su interés como un fitoterápico y por ser ampliamente utilizado para la limpieza bucal en las comunidades indígenas de Cotopaxi y Chimborazo, según MALDONADO E.(38)., el aceite esencial de Arrayán presenta un amplio espectro de acción bactericida sobre *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*, agentes causantes de la caries dental; NEIRA A.(47).; en su Publicación “Estudio fitoquímico y actividad Antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*”, señala su potencialidad antibacterial en forma de extracto etanólico; el Pumín es una rara especie de Salvia que crece solo en Perú y Ecuador, no posee información bibliográfica acerca de sus características terapéuticas, sin embargo en base a su conocimiento ancestral sabemos que posee propiedades antimicrobianas, antisépticas, útiles en caso de inflamación de las encías y limpieza dental.(64).

Actualmente, un dentífrico comercial contiene aditivos fuertes entre sus componentes, provocando sensibilidad dentaria según McBAIN, A (2003), el Triclosan que es un agente

microbicida, inhibe únicamente la colonización bacteriana, más no posee efecto alguno sobre la microbiota ya establecida sobre las superficies dentales.(40).; al igual que los dentífricos que incluyen alcohol inducen a una colonización bacteriana acelerada por ausencia de sustancias antibacteriales de la saliva.(21).

La fácil incorporación de productos naturales a la rutina diaria de higiene bucal, a incitado el estudio de las drogas vegetales seleccionadas (*Myrcianthes rhopaloides* y *Salvia squalens*), de las cuales se obtuvo su extracto fluido a partir de su percolación para evaluar su actividad antimicrobiana combinada en discos de sensibilidad frente a microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans*; y así para determinar la concentración óptima en la que muestran la mejor actividad antimicrobiana para su posterior incorporación en un dentífrico.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. FITOTERAPIA

Fitoterapia se denomina así a la ciencia que estudia el uso de las plantas con finalidad medicinales, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde la prehistoria.(33).

La fitoterapia, nunca ha dejado de tener vigencia. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vio enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces utilizaban se siguen usando hoy en día.(1).

1.1.1. MEDICINA TRADICIONAL

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el

diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales. (53).

1.1.1.1. LAS NUEVAS TENDENCIAS DE MEDICAMENTOS EN EL ECUADOR

En los últimos quince años en el país se produjeron notables cambios en la formulación de formas farmacéuticas sólidas, fundamentalmente en la incorporación de nuevos excipientes en la producción de medicamentos, en la actualidad, se tiende a incrementar el uso de agentes humectantes y deslizantes, simplificando de esta manera las formulaciones, estas requieren del agregado de sustancias excipientes que mejoren las características farmacotécnicas de los extractos en la línea de producción.

La elección de la forma farmacéutica más apropiada para un producto fitoterápico debe considerar los siguientes objetivos:

- a) Mantener la eficacia y la seguridad del componente activo y asegurar su calidad.
- b) Permitir la administración de la dosis efectiva del componente activo, con precisión adecuada a su empleo seguro y su adecuación a casos específicos.
- c) Resolver los problemas de estabilidad.
- d) Aumentar el nivel de adherencia al tratamiento confiriéndole características sensoriales (gustativas, olfativas y visuales) aceptables al producto. (6).

1.1.2. PLANTAS MEDICINALES

De acuerdo a la OMS, Planta Medicinal es todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o que son los precursores de hemisíntesis farmacéutica. El valor medicinal de una planta se debe a la presencia en sus tejidos de una o varias sustancias químicas conocidos como principios activos, son aquellos los compuestos de los medicamentos herbarios que tienen efecto terapéutico produciendo una acción fisiológica concreta sobre el organismo humano. (11).

Los constituyentes químicos se agrupan según su origen biosintético en:

a. TERPENOS Y ESTEROIDES

Monoterpenos: Constituye un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas, son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales obtenidos de hojas, raíces, corteza y flores de diversas plantas.

Sesquiterpenlactonas: Son derivadas biogenéticamente de los sesquiterpenos, sustancias amargas que se encuentran en todas las partes de las plantas, de gran importancia por la variada acción biológica por su acción citotóxica, antitumoral, analgésica, inhibidoras del crecimiento de bacterias, entre otras.

Diterpenos: Provee la función protectora en la planta, el crecimiento vegetal, actividad antitumoral, actividad irritante, actividad antiinflamatoria, edulcorante, etc.

Triterpenoides y Esteroides: Los triterpenoles y esteroles son sólidos, incoloros, cristalinos, ópticamente activos, de alto punto de fusión; los esteroles, generalmente tiene punto de fusión menos que 200°C y los triterpenoles mayor que 200°C. Las saponinas son glicósidos de ambos, triterpenos y esteroles, dan soluciones jabonosas, y algunos extractos crudos de plantas, Los glicósidos cardíacos tienen la habilidad de ejercer una específica y fuerte acción sobre el músculo cardíaco, son llamados también principios cardiotónicos. (43).

b. FLAVONOIDES

Son uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos, generalmente encontrados como aglicona y /o glicósidos, se hallan presentes en todas las partes de las plantas, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. Los flavonoides se emplea en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes, sirven como dilatadores de las coronarias, espasmolítica, antihepatotóxica, colerética, estrogénica, diurética, antimicrobiana y fungitóxica. (33).

c. CUMARINAS

Son compuestos ampliamente distribuidos en todas las partes de la planta desde la raíz a flores y frutos siendo más abundante en estos últimos. Poseen un amplio rango de actividad biológica: acción anticoagulante, antibacterial, antibiótica, hepatotoxicidad,

carcinogenicidad, fotosensibilizadora, insecticida como también aplicaciones como saborizantes y en perfumería.

d. CROMENOS Y BENZOFURANOS

Estos compuestos se encuentran presentes generalmente en hojas, tallos y raíces, han demostrado ser biológicamente activos siendo: bacteriostáticos, actividad antitumoral, fototóxicos a varios hongos y bacterias, acción insecticida. (33).

e. QUINONAS

Las quinonas son un grupo de compuestos cuya coloración puede ser desde el amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran frecuentemente en la corteza, en el corazón de la madera o de la raíz, y en algunos casos en las hojas, donde su color está enmascarado por otros pigmentos, han sido reconocidas por sus propiedades tintóreas; algunas presentan además otras propiedades como catártica, antimicótica, activa para la leishmaniasis, cilostática, bacteriostática, etc. (43).

f. ALCALOIDES

Los alcaloides constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas. Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas; al estado libre o como glicósidos, o formando sales con ácidos orgánicos, poseen significativa actividad farmacológica como:

antiespasmódico, anestésico local, sedante, analgésico, hipnótico, emético, expectorante, antipirético, amebicida, estimulante cardíaco, diurético, midriático, narcótico, tónico, emenagogo, antiséptico, vasoconstrictor, relajante muscular, antitumoral, hipotensoras. (33).

1.1.3. TIPOS DE PREPARACIONES FITOTERÁPICAS

a. TINTURAS

Tinturas son preparaciones donde el proceso de extracción de principios activos se ha llevado a cabo mediante una maceración, con alcohol-agua, con un grado alcohólico determinado, dependiendo de los principios activos de cada planta, la relación entre planta y disolvente puede variar del 10 al 20%. (11).

b. EXTRACTOS

Extracto es el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes. Entre las diferentes preparaciones galénicas, la Tintura Madre espárgica (extracto hidroalcohólico en el cual se encuentra toda la fuerza de la planta fresca) es el más elevado nivel cualitativo/cuantitativo. (11).

1.1.3.1. CLASIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Dependiendo del grado de concentración de los extractivos, los Extractos pueden clasificarse en:

Extractos fluidos o líquidos: Donde 1g.de planta equivale a 1g.de extracto. Tienen el inconveniente de que la mayor parte de alcohol, se ha evaporado en el proceso, y no actúa como conservante, por lo que su caducidad es corta.

Extractos semisólidos o blandos: Tienen una riqueza superior a la droga de partida, se obtienen evaporando el disolvente hasta obtener un producto de textura semisólida pero que no moja el papel de filtro.

Extractos secos: Contienen menos del 4% de agua. Dentro de los extractos secos, los más eficaces y con casi la totalidad de principios activos de las plantas. (11).

1.1.3.2. POTENCIA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

La potencia de los extractos herbarios habitualmente se expresa su potencia en términos del contenido de estos principios activos o de su potencia basándose en su concentración, para el extracto fluido es de 1:1 (5 o 10 veces más potentes que una tintura). (43).

1.2. ESPECIES VEGETALES

1.2.1. ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*)

1.2.1.1. TAXONOMÍA



FOTOGRAFÍA N° 1. RAMA DE ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*)

TABLA N° 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*)

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Fanerógama Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Myrtales
FAMILIA	<i>Myrtaceae</i>
ESPECIE	<i>Myrcianthes rhopaloides</i>

Fuente: LIZCANO, A. (32).

1.2.1.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Otros nombres: Arrayán. arrayán común, arrayán morisco, mata gallinas, mirto, murta, murtal, murtiñera, murtonera, murtones, murtrón.

Etimología del nombre científico: árabe Ar-Rayhan o Rihan -el “aromático”.

Partes de la planta utilizadas: hojas, frutos. (23).

1.2.1.3. COMPONENTES IMPORTANTES:

La esencia se compone de α - β pineno, cineol y mirtol, también se han encontrado flavonoides, quercitina, camferol, mircetina y dos glúcidos de miricetina. (23).

Entre los más importantes se encuentran: 1) Linalol (monoterpeno) es un alcohol terpénico ($C_{10}H_{18}O$) terciario insaturado y está presente en un porcentaje del 19%, por lo tanto sería un buen marcador químico en las pruebas de control de calidad del aceite. 2) Eucaliptol (monoterpeno) es un alcohol terpénico ($C_{10}H_{18}O$) y está presente en un porcentaje del 11,73%; se caracteriza por sus propiedades como balsámico, expectorante y antiséptico. 3) Limoneno es un hidrocarburo terpénico principal componente de muchos aceites esenciales, principalmente cítricos, y está presente en una concentración del 8,56%. (35).

1.2.1.4. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Arrayan es arbusto o árbol, con inflorescencias básicamente formadas de dicasios con la flor central sésil, flores 1–7; flores con 4–5 lóbulos del cáliz libres, imbricados en el botón, persistentes en el fruto; hipanto no prolongado sobre el ovario; pétalos en igual número que lóbulos del cáliz, conspicuos, blancos, imbricados y con pintas rosadas en el botón; ovario bilocular, óvulos en placenta central y bayas generalmente con una semilla madura. (1).

1.2.1.5. PROPIEDADES MEDICINALES

Para infecciones pulmonares y bronquiales, urinarias (cistitis) e intestinales es un poderoso antiséptico pulmonar usado en numerosas especialidades farmacéuticas en forma sobre todo de supositorios; el cocimiento de los frutos y hojas es muy útil para el cabello, limpia la caspa, deseca las llagas del cuero cabelludo y ennegrece el pelo, detiene su caída, por lo que es útil para prevenir la alopecia. (25).

1.2.2. SALVIA (*Salvia spp*)

1.2.2.1. TAXONOMÍA

TABLA N° 2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE SALVIA (*Salvia spp*)

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Tracheobionta
CLASE	Magnoliophyta
SUBCLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Asteridae
FAMILIA	Lamiales
SUBFAMILIA	Lamiaceae
TRIBU	Nepetoideae
GÉNERO	Mentheae
ESPECIE	<i>Salvia (S.spp)</i>

Fuente: KINTNZIOS, E; Sage, The Genus Salvia (30).

1.2.2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Tipo: planta subarborescente perenne

Parte medicinal utilizada: Las hojas y sumidades floridas.

Etimología del nombre científico: El término Salvia proviene de la palabra latina “salvare”, que significa “curar”. (60).

1.2.2.3. COMPONENTES IMPORTANTES:

Aceite esencial: hasta un 2,5%

- thuyona
- salveno
- borneol
- delta-alcanfor
- alfa y beta pineno
- cineol
- acetatos de bornilo y linalino
- picrosalvina

Flavonoides

- glucósidos de luteolina y apigenina
- esteroides vegetales (beta-sitosterina)

Principios amargos

- picrosalvina
- principio amargo diterpénico
- ácido labiático
- ácido clorogénico
- p-cumárico
- ácido oleánico
- ácido ursólico
- germanicol
- ácido fumárico
- ácido cafeico
- ácido nicotínico

Resinas

Taninos (60).

1.2.2.4. ESPECIES:

TABLA N° 3. CLASIFICACIÓN DE ESPECIES DE SALVIA

<i>Salvia adiantifolia</i>	<i>Salvia adoxoides</i>	<i>Salvia aérea</i>
<i>Salvia aethiopsis</i>	<i>Salvia alatipetiolata</i>	<i>Salvia prionitis</i>
<i>Salvia przewalskii</i>	<i>Salvia qimenensis</i>	<i>Salvia reflexa Hornem.</i>
<i>Salvia regla Cav.</i>	<i>Salvia riparia Kunth</i>	<i>Salvia roborowskii</i>
<i>Salvia roemeriana Scheele</i>	<i>Salvia scapiformis</i>	<i>Salvia schizocalyx</i>
<i>Salvia schizochila</i>	<i>Salvia sclarea L.</i>	<i>Salvia serotina L.</i>
<i>Salvia sikkimensis</i>	<i>Salvia sinica</i>	<i>Salvia smithii</i>
<i>Salvia sonchifolia</i>	<i>Salvia sonomensis Greene</i>	<i>Salvia spathacea reene</i>
<i>Salvia splendens Sellow</i>	<i>Salvia subincisa Benth.</i>	<i>Salvia subpalmatinervis</i>
<i>Salvia ubstolonifera</i>	<i>Salvia summa A.Nels.</i>	<i>Salvia texana Torr.</i>
<i>Salvia thomasiana Urban</i>	<i>Salvia iliifolia Vahl</i>	<i>Salvia tricuspis</i>
<i>Salvia trijuga</i>	<i>Salvia umbratica</i>	<i>Salvia urticifolia L.</i>
<i>Salvia aseyi Parish</i>	<i>Salvia vasta</i>	<i>Salvia verbenaca L.</i>
<i>Salvia longistyla Benth.</i>	<i>Salvia lycioides Gray</i>	<i>Salvia lyrata L.</i>
<i>Salvia mairei H.Lév.</i>	<i>Salvia aximowicziana</i>	<i>Salvia mellifera Greene</i>
<i>Salvia vansiana</i>	<i>Salvia farinacea Benth.</i>	<i>Salvia filicifolia</i>
<i>Salvia heterochroa</i>	<i>Salvia davidsonii</i>	<i>Salvia himmelbaurii</i>
<i>Salvia hupehensis Stibal</i>	<i>Salvia hylocharis</i>	<i>Salvia japonica</i>
<i>Salvia lemmonii Gray</i>	<i>Salvia leptophylla Benth.</i>	<i>Salvia leucophylla Greene</i>
<i>Salvia cavaleriei</i>	<i>Salvia chapmanii Gray</i>	<i>Salvia chienii</i>
<i>Salvia chinensis</i>	<i>Salvia chunganensis</i>	<i>Salvia cinnabarina</i>
<i>Salvia clevelandii Greene</i>	<i>Salvia coccinea P.J.Buchoz</i>	<i>Salvia columbariae Benth.</i>
<i>Salvia cyclostegia</i>	<i>Salvia cynica</i>	<i>Salvia dabieshanensis</i>

Fuente: KINTNZIOS, E; Sage, The Genus Salvia (30).

1.2.2.5. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.

Salvia crece en sitios rocosos y secos, se considera originaria de las regiones mediterráneas, en donde se obtiene buena parte de su esencia. Pero es ahora cultivada en muchos lugares alrededor del mundo. (64).

1.2.2.6. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Pertenece a la familia de las labiadas, arbusto de unos 60 cm de altura. El tallo es erecto, cuadrangular y leñoso, hojas pecioladas simples, oblongas o lanceoladas y estrechas en la base de color verde grisáceo, flores labiadas de color blanco, rosa o violeta pálido, aroma fuerte claro, herbáceo y penetrante, suele emplearse en perfumes masculinos. (30).

1.2.2.7. PARTES TERAPÉUTICAS:

En el caso de las hojas secas de la salvia son ideales para aliviar dolores de garganta, calman los trastornos comunes de la menopausia y para destetar al bebé, las hojas frescas, ayudan a estimular el aparato digestivo. (63).

1.2.2.8. ACTIVIDAD TERAPÉUTICA:

Bactericidas: Contra las afecciones respiratorias en general, garganta, gripe etc.

Cicatrizante y bactericida: (úlceras, cortes, heridas, etc) Para sanar las heridas y las úlceras, favoreciendo la cicatrización o impidiendo que esta herida pudiera infectarse.

Emenagogo: Rebaja ligeramente los dolores de la menstruación y facilita el vaciado.

Hipoglucemiante: Su uso disminuye la cantidad de azúcar en la sangre.

Relajante muscular: Muy útil como relajante muscular, en dolores producidos por estiramientos o esfuerzos demasiado grandes sin preparación previa.

Bucal: Con el vino mencionado anteriormente podemos realizar enjuagues bucales para fortalecer las encías. También podemos utilizar las hojas frescas para frotar las encías y los dientes y conseguir el mismo resultado. (Ayuda a eliminar la placa bacteriana, desinfecta y fortalece las encías sangrantes)

Mal olor: Reduce la sudoración excesiva por lo que resulta útil para combatir el mal olor corporal. Esta misma preparación puede utilizarse para realizar enjuagues bucales con los que combatir la halitosis o mal aliento en la boca.

Canas: Esta planta se utiliza como uno de los tintes naturales para el cabello. (30).

1.2.2.9. CONTRAINDICACIONES E INTERACCIONES

No se debe utilizar por periodos prolongados de tiempo, puede interferir con terapias hipoglucémicas, anticonvulsivantes y potenciar el efecto sedante de otras drogas. (64).

1.2.3. PUMÍN (*Salvia squalens*)



FOTOGRAFIA N°2. Pumín (*Salvia squalens*)

Esta Salvia es originaria de Perú y Ecuador, es muy extraña, florece todo el año; es muy aromática, su follaje externo es muy rígido, crecen en lugares apartados de otras plantas ya que solo se reproducen en suelos rocosos, su nombre se debe a que “squalens” significa sucio ya que su follaje es muy pegajoso donde atrapa a los insectos. (30).

1.3. SALUD BUCODENTAL

Se define como la ausencia de dolor orofacial crónico, cáncer de boca o garganta, llagas bucales, defectos congénitos como labio leporino o paladar hendido, enfermedades periodontales (de las encías), caries dental y pérdida de dientes, y otras enfermedades y trastornos que afectan a la boca y la cavidad bucal.

Las enfermedades orales son de carácter progresivo y acumulativo, siendo difíciles de controlar a medida que pasa el tiempo y avanza su historia natural. La boca es una cavidad del organismo con una gran variedad de bacterias, esto dificulta su control ya que encuentran condiciones de temperatura, humedad y nutrientes ideales para su desarrollo y la consecuente aparición de patologías. (22).

1.3.1. MICROBIOLOGÍA BUCAL

La boca es un ecosistema abierto y dinámico, la proporción de los microorganismos se ve sometida a grandes variaciones que indudablemente, definen y diferencian una boca sana de una enferma. (20).

En la cavidad oral crece una microbiota de gran complejidad por su hábitat variado, existen elementos ecológicos múltiples que favorecen la selección de ciertas especies determinando la variabilidad dentro del proceso infeccioso, su instalación definitiva se basa en la presencia de la placa dental, misma que puede clasificarse en términos de su localización en supragingival, esta contiene flora predominantemente Gram positiva que a menudo posee microorganismos cariogénicos, mientras que la placa subgingival es menos adherible que la supragingival y está compuesta por microorganismos Gram negativos que suelen ser periodontopáticos, las características patogénicas de la lesión dependen de las propiedades de las especies bacterianas infectantes, la condición del tejido pulpar para producir un proceso agudo originando a largo plazo osteomielitis. (52).

1.3.2. PATÓGENOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES

La microbiota normal de un individuo se define como un conjunto de microorganismos que colonizan permanentemente a la mayoría de individuos sanos, lo que se debe a la capacidad de los microorganismos para adherirse a los epitelios, la que incluye un gran número de especies que han experimentado un proceso de evolución adaptativa. (31).

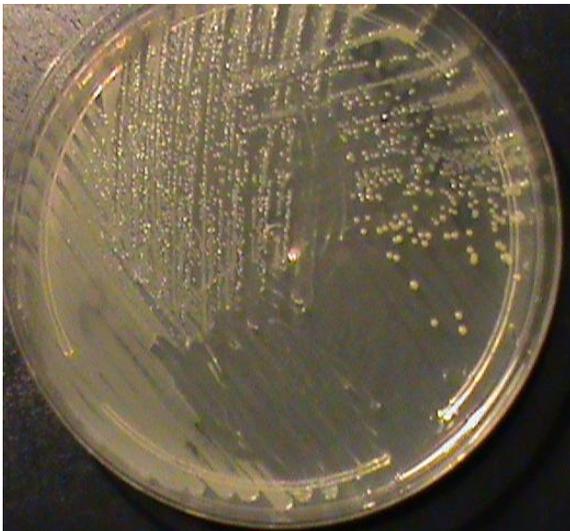
TABLA N° 4. MICROBIOTA CULTIVABLE DE LA BOCA

MICROBIOTA CULTIVABLE DE LA BOCA	COCOS	Aerobios	Gram positivos	<i>Streptococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Gernella</i> <i>Granulicatella</i>
			Gram negativos	<i>Neisseria</i>
			Gram positivos	<i>Peptostreptococcus</i>
		Anaerobios	Gram negativos	<i>Veionella</i>
			Gram positivos	<i>Lactobacillus</i>
			BACILOS	Aerobios
	Gram positivos	<i>Actinomices</i>		
	Anaerobios	Gram negativos		

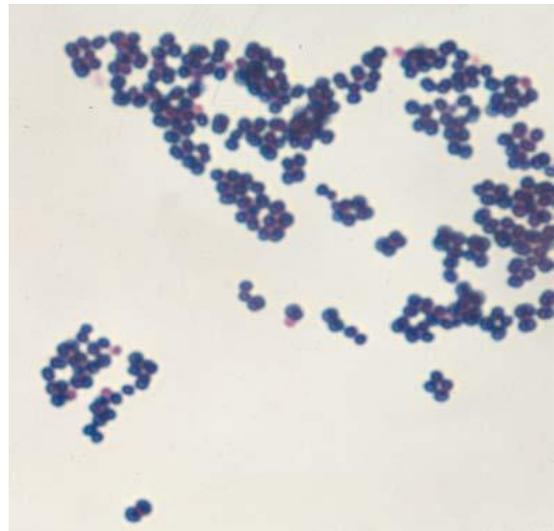
Fuente: "Periodontitis, An archetypical biofilm disease" (66).

Atendiendo a la capacidad de colonización de las bacterias se las puede dividir en dos grupos: residentes y transeúntes, éstas últimas se encuentran en la superficie epitelial, son fáciles de eliminar, y provienen del contacto con diversos elementos ambientales como tierra, polvo, alimentos, etc; de acuerdo a THAWEBEON (2009), diferentes ensayos clínicos han probado que el uso indiscriminado de antibióticos en la práctica clínica y la creciente automedicación, indica que de alrededor de 5.6% de infecciones tratadas con antibióticos, cerca de 4% de los microorganismos que producen la infección se vuelve resistente durante la terapia. (73).

1.3.2.1. *Staphylococcus aureus*



FOTOGRAFIA N° 3. Morfología macroscópica *Staphylococcus aureus*



FOTOGRAFIA N° 4. Morfología microscópica de *Staphylococcus aureus*

a. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Staphylococcus aureus*

TABLA N°5. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Staphylococcus aureus*

REINO	Bacteria
FILO	Firmicutes
CLASE	Bacilli
ORDEN	Bacillales
FAMILIA	Staphylococcaceae
GÉNERO	<i>Staphylococcus</i>
ESPECIE	<i>S. aureus</i>

Fuente: MALACHOWA N (37).

b. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE *Staphylococcus aureus*

Colonias opacas, circulares, lisas y enteras, su consistencia es mantecosa, Gram positivas; crece en TSA o Agar nutritivo, en Agar sangre desarrollan colonias de 2-3 μm de diámetro en 24 horas; no forman esporas, sus diámetros varían entre 0,7 y 1,2 μm , crecen en cultivos con altas concentraciones de cloruro de sodio y bilis. *S. aureus* es un coco inmóvil, capaz de presentarse aislado, en pares, en cadenas cortas o en racimos irregulares, siendo la última disposición la más característica, redondas, convexas, cuando están bien aisladas tienen 1 a 3 mm de diámetro y de color amarillo dorado debido a un pigmento compuesto de dos carotenoides, d-caroteno y sarcinaxantina; al menos el 90% de cepas son resistentes a la penicilina alterando el sitio de ataque. (18). Para su identificación se realizan ensayos característicos para cada grupo, estos son: coagulasa positivo, fermentación de glucosa positiva, fermentación de manitol positivo, fosfatasa positiva, endonucleasas resistentes al calor positivo. (74).

c. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Staphylococcus aureus*

S. aureus produce una gran variedad de proteínas que contribuyen a su capacidad para colonizar y causar enfermedades en el ser humano, dentro de estas, hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa, su función principal es ayudar a degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias. (7).

TABLA N°6 PRINCIPALES FACTORES DE VIRULENCIA DE *Staphylococcus aureus*

ESTRUCTURALES	ENZIMAS	TOXINAS
Peptidoglucano	Catalasa	Toxina α (Hemolisina α)
Proteína A	hialuronidasa	Hemolisina β
Factores de adhesión	Lipasas	Hemolisina γ
Ácidos teicoicos	Coagulasa	Hemolisina δ
Polisacáridos capsulares	Nucleasas Proteasas Estafilocinasa Colagenasa	Leucocidina de Pantone-Valentine (PVL) Enterotoxinas estafilocócicas(SE) Toxina 1 del síndrome del shock tóxico Toxinas exfoliativas (ETAyETB)

Fuente: MALACHOWA N.

Los factores de virulencia de *S. aureus* participan en la adhesión y adquisición de nutrientes para el microorganismo y sirven también para evadir la respuesta inmune del huésped. En base a esto los factores se han clasificado en tres categorías: 1) los involucrados en la adherencia a la célula huésped o matriz extracelular, como las proteínas de unión a fibrinógeno, fibronectina, colágeno y coagulasa; 2) aquellos que están involucrados en la evasión de las defensas del huésped, como las enterotoxinas estafilocócicas; la TSST-1, la leucocidina de Pantone-Valentine (PVL), proteína A, lipasas, y polisacáridos capsulares; 3)

los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos, como la toxina α , hemolisinas β , γ y δ . (37).

Entre los más importantes se encuentran: 1) Coagulasa producida por *S. aureus* unida a la pared celular se une a la protrombina, este complejo transforma el fibrinógeno en fibrina insoluble y esto provoca su aglomeración, se lo utiliza como marcador de la virulencia y permite diferenciar a *S. aureus* (coagulasa positivo) de otras especies estafilocócicas (coagulasa negativas); 2) Hemolisinas son proteínas, de las cuales hemolisina α es termolábil, pero produce lisis de eritrocitos y toxicidad para otras líneas celulares; bloquea la repolarización de la membrana plasmática, por lo cual genera contracción de la musculatura lisa y vasoconstricción, hemolisina β tiene actividad de fosfolipasa, la cual es específica para la esfingomiélin y liso-fosfatidilcolina. La diferencia en la susceptibilidad de los eritrocitos a la hemolisina β se debe al diferente contenido de esfingomiélin en los eritrocitos. Su función durante la enfermedad no está determinada claramente. Sin embargo, se ha visto que le produce una ventaja selectiva a la bacteria, hemolisina γ afecta a neutrófilos, macrófagos y a una gran variedad de eritrocitos de mamíferos; 3) Leucocidina, proteína que ayuda al microorganismo a sobrevivir dentro de los fagosomas leucocitarios; 4) Hialuronidasa, enzima que degrada el tejido conectivo, permitiendo el avance del microorganismo hacia zonas más profundas. 5) Estafiloquinasa, enzima que disuelve los coágulos de fibrina; 6) Lipasas, enzima que degradan los ácidos grasos presentes en los tejidos cutáneos sanos; 7) Toxina exfoliativa, genera la separación del tejido intraepidérmico, produciendo el síndrome de la piel escaldada. (37).

d. PATOGENICIDAD DE *Staphylococcus aureus*

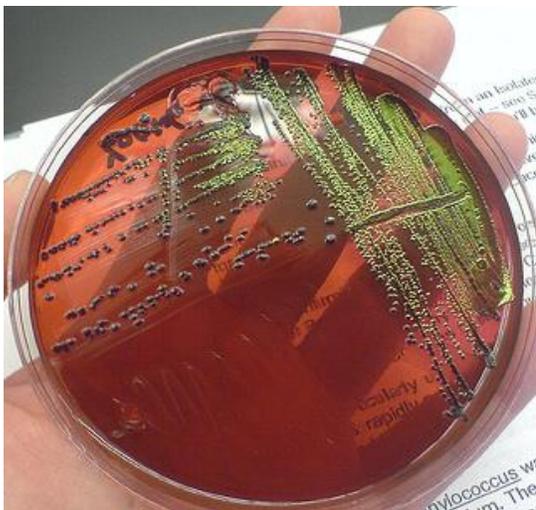
S. aureus es responsable de la mayoría de las infecciones cutáneas agudas más frecuentes, como foliculitis, forúnculos y carbúnculos, en el primer caso se trata del nombre vulgar que recibe una erupción pustulosa aguda en la piel peribucal; en el segundo caso, la osteomielitis es más común en la mandíbula que en el maxilar superior, suele presentarse después de que una caries dental que progresa a infección peribucal intraósea.

Las infecciones más comunes provocadas son las siguientes: Estafilocócicas cutáneas, catéteres infectados, neumonía estafilocócica, gastroenteritis estafilocócica y síndrome de shock tóxico, infecciones pleuropulmonares, cardíacas y genitourinarias. (7).

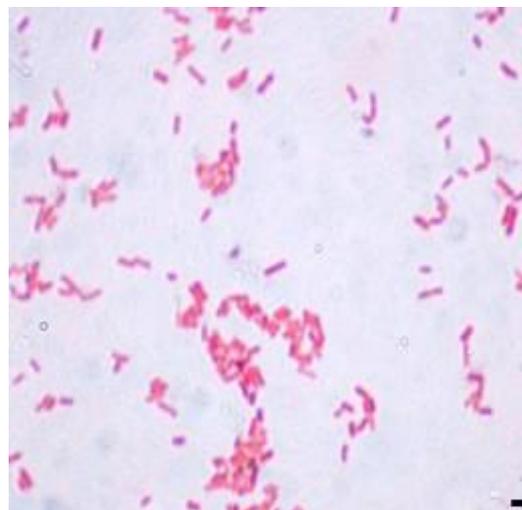
e. AISLAMIENTO DE *Staphylococcus aureus*

S. aureus es uno de los gérmenes de más fácil cultivo *in-vitro* en agar o caldo nutritivo, desarrollándose en un rango de temperatura entre 12 y 46°C en aerobiosis o anaerobiosis, en caldo su crecimiento se traduce en un enturbiamiento homogéneo después de 24 horas, apareciendo a menudo en la superficie un collar a lo largo de la pared del tubo o incluso una película, un “velo”, en medio líquido no se observa pigmento, es posible hallar colonias mucoides, de contornos netos y de superficie lisa y brillante, de 1-2 mm de diámetro; casi todas las cepas de *S. aureus* muestran rápida hemólisis, pero algunas no la producen o esta es débil. (74).

1.3.2.2. *Escherichia coli*



FOTOGRAFIA N°5. Morfología macroscópica de *Escherichia coli*



FOTOGRAFIA N° 6. Morfología microscópica de *Escherichia coli*

a. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Escherichia coli*

TABLA N°7. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Escherichia coli*

REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	Gammaproteobacteria
ORDEN	Enterobacterales
FAMILIA	Enterobacteriaceae
GENERO	<i>Escherichia</i>
ESPECIE	<i>E. coli</i>

Fuente: HUGUET J (28).

b. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

E. coli pertenece un grupo conformado de bacterias formado por bacilos rectos Gram negativas, generalmente flagelados peritricos móviles, pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias y son fácilmente cultivables en medios nutritivos sencillos, las cepas de estructura antigénica suelen ser más bien tóxicas y resistentes a la fagocitosis, sus colonias suelen tener un aspecto mucoso. (28). Para la identificación de *E. coli* se realizan ensayos característicos para cada grupo, estos son: Catabolizan glucosa, lactosa y otros azúcares, mientras que no pueden utilizar urea ni citratos. indol positivo, voges-proskauer negativo, sulfuro de hidrogeno negativo, motilidad positivo. (57).

c. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli*

Su capacidad de producir infecciones extraintestinales se debe a la adquisición de genes que codifican diversos factores de virulencia, los cuales hacen posible que causen infecciones en focos distintos al intestinal, tanto en pacientes normales como en pacientes inmunodeprimidos. Entre estos factores de virulencia presentes en la mayoría de las cepas son implicadas en la adherencia de las bacterias a las células o adhesinas (fimbrias tipo 1 y fimbrias tipo P), factores que permiten evitar o sobrevivir a los sistemas de defensa del huésped (como cápsulas y lipopolisacáridos), mecanismos de adquisición de nutrientes (sideróforos), proteasas, invasinas y toxinas (hemolisina y factor citotóxico necrosante)² y puede variar entre los diferentes síndromes o tipos de infección. (63).

Sin embargo, además de la presencia o ausencia de los factores de virulencia, también es importante la expresión variable y la diversidad funcional de los mismos. Estas cepas de *E. coli* pueden ser asignadas a uno de los cuatro principales grupos filogenéticos: A, B1, B2 y D. los grupos considerados más virulentos son más sensibles a las quinolonas que los considerados comensales. Por lo tanto, parece existir una relación inversa entre capacidad de virulencia y su resistencia a quinolonas. Los factores de virulencia ausentes en estas cepas son frecuentemente asociados o contenidos en islas de patogenicidad (fimbrias de tipo P y S, hemolisina, etc.), estos son elementos genéticos móviles que pueden transmitirse vertical y horizontalmente de unas cepas a otras. (15).

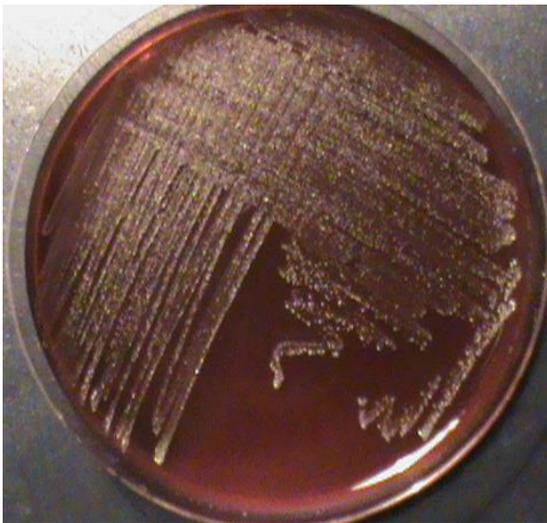
d. PATOGENICIDAD DE *Escherichia coli*

E. coli es un huésped habitual del tracto intestinal del hombre, no se lo considera patógeno, pero debido a su fácil cultivo es usado como índice de potabilidad del agua de consumo humano, se la involucra con infecciones en el tracto urinario, aunque son divididas en extraintestinales e intestinales, las cuales puede producir: septicemia, meningitis, neumonía, sobreinfecciones periodontales debido a que son microorganismos exógenos es decir, que no son habituales en la boca y que no producen afecciones típicas bucales, la presencia de bacterias entéricas podría complicar el cuadro clínico de pacientes con periodontitis, las cuales podrían llevar a complicaciones sistémicas al entrar en el torrente sanguíneo, induciendo septicemias, de esta manera las enterobacterias en placa subgingival aumentaría el riesgo de enfermedad cardiovascular. (28).

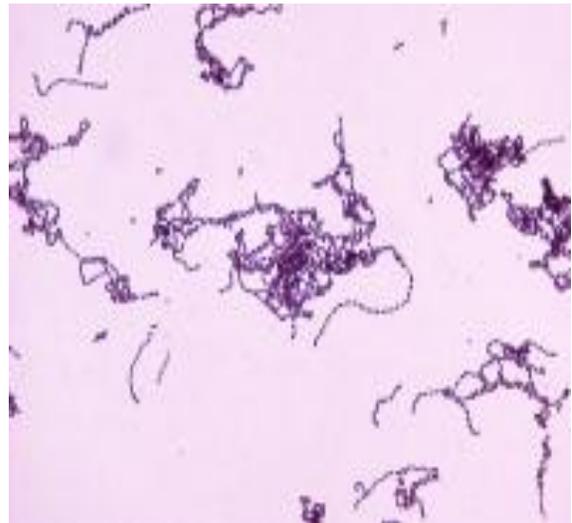
e. AISLAMIENTO DE *Escherichia coli*

En caldo simple crece abundantemente enturbiando homogéneamente el líquido formándose en la superficie un anillo, presentando un fuerte olor fecaloideo. Las colonias en agar son circulares de 3 a 5 mm, convexas, de borde continuo o ligeramente ondulado, brillantes, de color blanco o ligeramente amarillento a una temperatura de 37°C y 7 de pH. Para diferenciar *E. coli* de *Enterobacter aerogenes* se utiliza agar Levine con eosina y azul de metileno, donde la presencia de brillo metálico y el pequeño tamaño de las colonias la distinguen. (57).

1.3.2.3. *Streptococcus pyogenes*



FOTOGRAFIA N° 7. Morfología macroscópica de *Streptococcus pyogenes*



FOTOGRAFIA N° 8. Morfología microscópica de *Streptococcus pyogenes*

a. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Streptococcus pyogenes*

TABLA N°8. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Streptococcus pyogenes*

REINO	Bacteria
FILO	Firmicutes
CLASE	Bacilli
ORDEN	Lactobacillales
FAMILIA	Streptococcaceae
GENERO	<i>Streptococcus</i>
ESPECIE	<i>S. pyogenes</i>

Fuente: MITROPHANOVA A. (44).

**b. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE
*Streptococcus pyogenes***

S. pyogenes se presenta microscópicamente como células esféricas u ovoides de 0.6-1.0 μm de diámetro y se agrupa en pares o cadenas de longitud variable, Gram positivos, inmóviles, no formadores de esporas y facultativamente anaerobios, requiere medios complejos enriquecidos con sangre para su desarrollo óptimo, donde se observan colonias grises de 1-2 mm de diámetro un halo de hemólisis beta. (44).

Para la identificación de *S. pyogenes* se realizan ensayos característicos para cada grupo, estos son: bacitracina positivo, PYR (pirridonil naftilamida) positivo, prueba de camp negativo, catalasa negativo, bilis esculina negativo. (58).

c. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Streptococcus pyogenes*

Entre los más importantes se encuentran: 1) Proteína M, produce toxicidad tisular y forman además numerosas exotoxinas. Las hemolisinas, estreptolisinas O y S, destruyen las membranas de los eritrocitos y otras células. La estreptolisina O actúa como antígeno que puede demostrarse midiendo los anticuerpos desarrollados frente a esta toxina. Las exotoxinas estreptocócicas pirogénicas (EEP) A, B y C son las responsables de la fiebre, exantema y enantema en la escarlatina, así como de la sepsis y del síndrome de shock tóxico. Actúan como superantígenos que provocan una liberación de grandes cantidades de citoquinas. Las enzimas estreptoquinasa, ADNasa y hialuronidasa favorecen la proliferación tisular de la infección; 2) Estreptoquinasa (fibrinolisisina), sustancia transforma el plasminógeno del plasma humano en plasmina, una enzima proteolítica que digiere la fibrina y otras proteínas; 3) Exotoxinas pirógenas (toxina eritrógena), existen tres exotoxinas pirógenas estreptocócicas: A, B Y C antigénicamente distintas, se han vinculado con el síndrome de shock tóxico estreptocócico y con la fiebre escarlatina. 4) Difosfopiridina nucleotidasa, sustancia que puede vincularse con la capacidad de los organismos para matar los leucocitos; 5) Hemolisinas, muchos estreptococos pueden causar hemólisis de grado variable de los eritrocitos *in vitro*. (44).

d. PATOGENICIDAD DE *Streptococcus pyogenes*

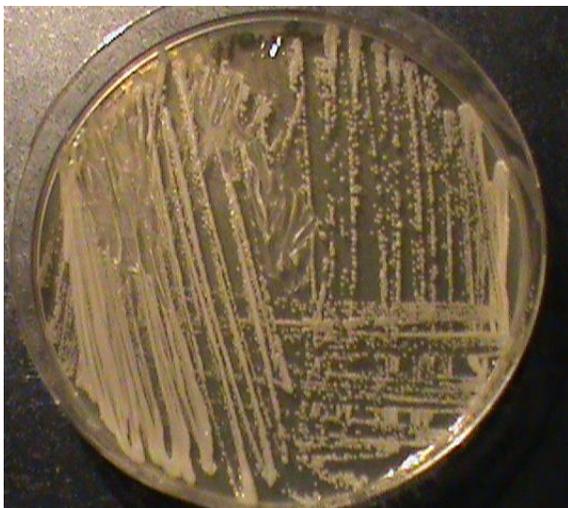
S. pyogenes beta hemolítico responsable de la faringitis, amigdalitis y algunas formas atípicas de mucositis y gingivitis; junto con *S. viridans* considerado un habitante normal de

la cavidad oral y que tiene importancia en la patogenia de la caries dental y la endocarditis bacteriana se podrían agrupar de manera muy breve en faringo-amigdalitis, a los pocos días pueden aparecer petequias en el paladar blando provocando severos trastornos en la mucosa oral, alargamiento de úvula, la superficie dorsal de la lengua se vuelve blanquecina y las papilas fungiformes se observan eritematosas y aumentan de tamaño, su estado crónico se denomina endocarditis bacteriana subaguda y es motivo de gran preocupación en la práctica odontológica. (58).

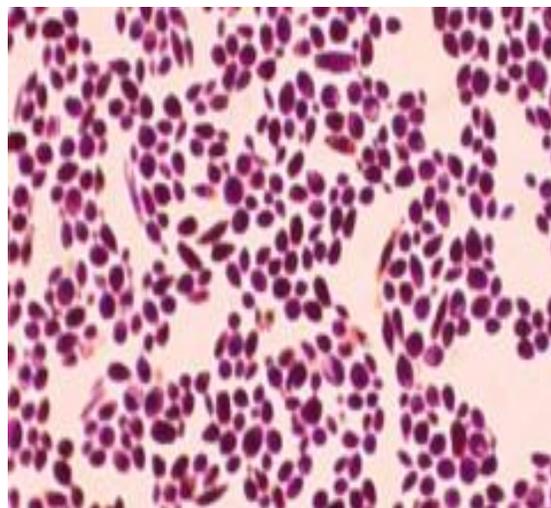
e. AISLAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes son cocos esféricos de 0,5 a 1,0 mm que forman cadenas cortas en las muestras clínicas y cadenas más largas, su crecimiento es óptimo en un medio de agar sangre enriquecido, pero se inhibe si el medio contiene una concentración elevada de glucosa, después de 24 horas de incubación se observan colonias blancas de 1 a 2 mm con grandes zonas de Beta hemólisis; las cepas encapsuladas pueden presentar una apariencia mucoide en los medios recién preparados pero pueden estar arrugadas en los medios secos; las no encapsuladas son pequeñas y brillantes. La pared celular es la capa de peptidoglicanos, que tiene una composición parecida a las de las bacterias grampositivas. (74).

1.3.2.4. *Candida albicans*



FOTOGRAFIA N° 9. Morfología macroscópica de *Candida albicans*



FOTOGRAFIA N° 10. Morfología microscópica de *Candida albicans*

a. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Candida albicans*

TABLA N°9. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Candida albicans*

REINO	Fungí
FILO	Deuteromiceta
CLASE	Saccharomycetes
ORDEN	Saccharomycetales
FAMILIA	Saccharomycetaceae
GENERO	<i>Candida</i>
ESPECIE	<i>C. albicans</i>

Fuente: SILVA V., (68).

b. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y BIOQUÍMICA DE *Candida albicans*

Levadura ovaladas u oblongas de 2,5 por 3-14 μ m y de paredes delgadas, se presentan solas o en racimos, presentan coloración azul al Gram, forma clamidiosporas de pared gruesa sostenidas aisladamente o en racimos, habitualmente en los ápices de pseudohifas y blastoconidias producidas en densos racimos regularmente espaciados a lo largo de las pseudohifas, es una levadura dimorfa capaz de producir hifas y micelios verdaderos, a menudo forma pseudomicelios compuestos de pseudohifas.

Para su identificación se realizan ensayos característicos, estos son: dextrosa, maltosa, galactosa y sacarosa positivo, lactosa y ureasa negativo, pseudohifas positivo. (77).

c. FACTORES DE VIRULENCIA DE *Candida albicans*

Presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos cabe mencionar el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, el cual favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador; también existen otros tipos de factores de virulencia, tales como: 1) Adhesinas: que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres, 2) Proteinasas y fosfolipasas: Las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador, 3) Tigmotropismo: que permite

encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos, 4) Producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras. (77).

d. PATOGENICIDAD DE *Candida albicans*

C. albicans y otras especies de este género habitan normalmente la piel y mucosas faríngea, vaginal e intestinal; solo en determinadas circunstancias dan origen a lesiones y procesos diversos, de carácter agudo, subagudo o crónico, agrupados con el nombre de candidiasis o monoliasis. En general las infecciones por levaduras se ven primariamente en pacientes debilitados o con enfermedad crónica o que están inmunocomprometidos con alteración de los mecanismos de defensa por la administración de corticoides, agentes citotóxicos o inmunosupresores o sometidos al uso indiscriminado de antibióticos. (68).

Puede causar infecciones en mucosas, esofagitis por *Candida*, candidiasis gastrointestinal, otitis, síndromes cutáneos, candidiásicos, candidiasis diseminada, vaginitis, que se observa sobretodo en mujeres embarazadas o tratadas con antibióticos. La candidiasis es la más frecuente de las micosis sistémicas, causa alrededor del 25% de todas las muertes dependientes de hongos. (77).

e. AISLAMIENTO DE *Candida albicans*

C. albicans crece rápidamente en agar Sabouraud, agar sangre, soya tripticasa y en otros medios enriquecidos; produce colonias irregulares, cremosas, húmedas, opacas y al envejecer desarrollan hifas al interior del agar; son capaces de desarrollarse a 37°C o a

temperatura ambiente, es aerobio, diminutas colonias suelen ser visibles ya a las 24-36 horas. Alcanzan un tamaño de 1,5 a 2 mm en aproximadamente una semana en agar Sabouraud, las colonias por lo general son de color blanco vivo pero pueden tornarse cremas o bronce al envejecer. (76).

1.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS

Agentes antimicrobianos son sustancias químicas que impide el desarrollo o favorece la muerte de un microorganismo, es activo cuando inhibe el crecimiento de las bacterias, y no existe turbidez alguna, es decir, si se hace un traspaso a una placa de Agar, todavía habrá bacterias vivas que se desarrollan y por lo tanto están inhibidas y no muertas. (55).

Los agentes antimicrobianos pueden ser de tres tipos:

Desinfectantes: Sustancias que eliminan la viabilidad microbiana, aplicables sólo a sistemas inanimados.

Antisépticos: Sustancias que reducen y controlan la presencia de gérmenes potencialmente patógenos, aplicables sobre la piel o mucosas de humanos y animales.

Antimicrobianos de uso clínico-terapéutico: Drogas capaces de reducir y controlar la presencia de gérmenes que han invadido los tejidos de un individuo. (52).

1.4.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Actividad antimicrobiana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de población bacteriana o para eliminarla, se puede expresar cuantitativamente

con pruebas *in vitro*. Entre los factores que inciden sobre la actividad antimicrobiana se encuentran: Tiempo de contacto, concentración, temperatura, reacción de medio (pH), influencia de sustancias presentes, espectro antimicrobiano, estabilidad del desinfectante, resistencia microbiana, incompatibilidades. (73).

1.4.2. SENSIBILIDAD BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

La sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos no se puede predecir, cada patógeno debe ser analizado por separado para poder elegir el más activo contra el patógeno, el menos tóxico para el huésped, con las características farmacológicas apropiadas, y que proporcione mayores posibilidades de una evolución favorable. (55).

Las pruebas *in vitro*, proporcionan un resultado cuantitativo de la concentración de agente antimicrobiano, necesaria para inhibir el desarrollo de un organismo dado, entre las que se encuentran:

1.4.2.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

Concentración mínima inhibitoria es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana, en el laboratorio se la determina mediante la incubación de un inóculo de concentración conocida, con diluciones definidas del agente antimicrobiano. (3).

a. Principio del Método de Difusión en Agar según Kirby-Bauer

El método de Kirby-Bauer se basa en la aplicación de discos que tiene una cantidad específica de antimicrobiano sobre la superficie de agar inoculado con un microorganismo; produciendo una zona de inhibición por difusión, en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano, la zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente con la CMI. (3).

b. Interpretación de Pruebas de Sensibilidad Bacteriana a los agentes antimicrobianos por Método de Difusión en Agar

Para cada agente antimicrobiano se establecen “concentraciones críticas o puntos de corte”, que incluyen información sobre la distribución de los diámetros de inhibición para un determinado antibiótico en variadas poblaciones bacterianas, permitiendo separar a los microorganismos en 3 categorías:

- **Sensibles:** establece que la infección dada por el microorganismo en estudio puede ser tratada apropiadamente con las dosis habituales del antibiótico recomendado.
- **Sensibilidad intermedia:** incluye microorganismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma, por lo que pueden responder pobremente a la terapia, además, implica que el antibiótico puede ser usado si la infección se encuentra en sitios donde el fármaco es fisiológicamente concentrado.

- **Resistentes:** significa que el microorganismo no es inhibido por el antibiótico en dosis habituales o que presenta mecanismos de resistencia contra ese determinado antibiótico. (13).

1.4.2.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Su objetivo es determinar la menor concentración de un antimicrobiano capaz de matar una cepa bacteriana, con el fin de compararla con la que alcanza en una determinada localización. Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria y el antimicrobiano se enfrentan en un caldo, partiendo de los métodos utilizados para obtener la CMI por dilución en caldo y sus modificaciones para bacterias exigentes. (61).

TABLA N°10. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CMB

Fase de crecimiento	Las bacterias supervivientes aumentan en la fase estacionaria.
Tipo de tubo o de vidrio	La adherencia al tubo depende del material.
Agitación a las 24h	Es preciso la agitación con vortex para la suspensión.
Reincubación / reagitación	Permite destruir las bacterias que estaban adheridas por encima del menisco, antes de la agitación de 24h.
Transporte de antibiótico	Conduce a un falso recuento bajo en las concentraciones altas de antibiótico
Reincubación del medio	Los microorganismos exigentes necesitan incubación de 48 y 72h respectivamente.

Fuente: ANDREWS J. (3).

1.4.2.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Para que el agente antimicrobiano ejerza su acción es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias y alcance intracelularmente la concentración necesaria, una vez dentro de la célula el antibiótico puede ser bacteriostático si inhibe la multiplicación de forma reversible, o bactericida si tiene un efecto letal. (48).

Los antibióticos de uso en clínica pueden ejercer su acción en una de las siguientes estructuras o funciones: 1.- Inhibición de la síntesis de la pared celular: actúan desarrollando puntos frágiles en la pared celular debido a la síntesis de peptidoglicano deficiente, lo que origina que sea osmóticamente frágil. 2.- Alteración sobre la membrana citoplásmica: modifican la permeabilidad, permitiendo la salida de iones K y macromoléculas como los ácidos nucleicos y causan un efecto lítico. 3.- Inhibición de la síntesis proteica. Reaccionan con el complejo ribosoma-mRNA teniendo una acción selectiva frente a bacterias. 4.- Bloqueo de la síntesis de los ácidos nucleicos: inhiben la replicación o paran la transcripción.

Sin embargo, el agente antimicrobiano ideal para tratar las infecciones microbianas debe reunir las siguientes cualidades:

- a) Capacidad para destruir o inhibir muchos tipos de microorganismos patógenos, evitando el desarrollo de resistencia hacia el agente antimicrobiano administrado.
- b) No debe eliminar la microbiota normal del tracto intestinal o de otras áreas del cuerpo ya que estos microorganismos evitan el crecimiento de microorganismos patógenos.

- c) No debe producir efectos secundarios no deseables en el paciente tales como reacciones alérgicas, daño al sistema nervioso, a los riñones o irritaciones del tracto gastrointestinal.
- d) Altamente soluble en los fluidos corporales, y no depender de su vía de administración para su actividad.
- e) Alcanzar una concentración lo suficientemente alta en los tejidos o la sangre del paciente para ejercer su acción. (55).

1.4.3. RESISTENCIA BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

La prescripción libre de medicamentos, su dosis o duración inadecuada de la terapia, influye en la aparición de resistencias bacterianas, de los cuales se conoce: 1. Resistencia natural, determinada genéticamente, no se encuentra relacionada con el incremento de la dosis del antibiótico; 2. Resistencia adquirida, aparece por cambios puntuales en el DNA.; 3. Resistencia relativa o intermedia, ocurre por un incremento gradual de la CMI (concentración inhibitoria mínima) a través del tiempo, la susceptibilidad o resistencia del germen depende de la concentración del antimicrobiano.; 4. Resistencia absoluta, producida por un incremento súbito en la CMI durante o después de la terapia.; 5. Seudoresistencia, esta origina una resistencia in vitro pero gran efectividad in vivo. (70).

1.4.3.1. MECANISMO DE RESISTENCIA BACTERIANA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

Desde un punto de vista molecular y bioquímico los mecanismos de resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos pueden presentarse de las siguientes formas:

a. Destrucción e inactivación del antibiótico:

Es un sistema enzimático amplio, común y eficiente de resistencia, producida por bacterias Gram negativas, y se encuentra clasificado: por su forma de producción, por localización genética (cromosomas o plásmidos), por exposición genética (constitutiva o inducida), por producción primaria (depende del microorganismo) y por sustrato mayor (depende de la clase de antibiótico).

b. Barreras de permeabilidad:

Incluye tres componentes básicos: La estructura de la membrana externa de la bacteria, las porinas que son canales inespecíficos que excluyen el antibiótico, y las características fisicoquímicas del antimicrobiano.

Entrada disminuida: 1) Permeabilidad de la membrana externa: definida en los microorganismos Gram negativos que poseen una membrana lipídica externa que constituye una barrera intrínseca para la penetración de antibiótico. 2) Permeabilidad de la

membrana interna: consiste en una modificación energética que compromete el transportador aniónico que lleva el antibiótico hacia el interior de la célula. La presencia de capa lipídica en la membrana actúa como un mecanismo de resistencia para medicamentos hidrofóbicos. 3) Porinas: son canales de difusión presentes en la membrana externa de la bacteria., su diámetro suele ser inferior al de la molécula del antibiótico.

Eflujo activo: Debido a la presencia de proteínas de membrana especializadas, altera la producción de energía y disminuye no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez, las bacterias reducen la concentración del antibiótico en sangre.

c. Alteración del sitio blanco:

Se basa en la modificación de sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, etc; de esta manera la modificación de enzimas catalizadoras en la producción de proteoglicanos celulares. (70).

1.4.4. TOLERANCIA ANTIMICROBIANA

La tolerancia a un antimicrobiano es la capacidad de un microorganismo de permitir su inhibición, pero sin ser eliminado, es decir, potestad de algunas especies a tolerar ciertos antimicrobianos, esta tolerancia se lograría contrarrestar mediante la combinación sinérgica de dos antimicrobianos. (48).

1.4.5. AGENTE ANTIMICROBIANO DE ORIGEN VEGETAL

Los compuestos antimicrobianos de las plantas pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos, la mayoría de estos compuestos encontrados en las plantas son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; sus sitios de acción sobre la célula microbiana incluye a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético. (8).

1.4.6. ACTIVIDAD COMBINADA DE ANTIMICROBIANOS

La combinación de antimicrobianos se utiliza principalmente para pacientes que sufren infecciones graves y que pueden llegar a desarrollar una septicemia, se lo se lo utiliza cuando un microorganismo es resistente a un antimicrobiano, pero se muestra sensible en asociación con otro, en los dos casos, lo que se consigue es disminuir la probabilidad de aparición de subpoblaciones que sean resistentes a todos los antimicrobianos administrados. (10).

1.4.6.1. INTERACCIONES ENTRE AGENTES ANTIMICROBIANOS

Los efectos en la actividad combinada de dos antimicrobianos pueden ser los siguientes:

Indiferencia: la actividad de los dos antimicrobianos no difiere de la actividad del más efectivo en solitario.

Adición: la actividad de los dos antimicrobianos es la aproximadamente la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

Sinergismo: la actividad de los dos antimicrobianos es significativamente mayor que la adición de las actividades de los dos antimicrobianos separados.

Antagonismo: la actividad de los dos antimicrobianos juntos es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos separados. (10).

1.5. PRODUCTOS GRAS (Generally recognized as safe)

Designación establecida por la FDA (Food and Drug Administration) a cualquier producto químico o sustancia añadida a los alimentos, "GRAS" significa G enerally R ecognized A s S afe, es decir que es considerado como seguro, estos se añaden intencionadamente, y sujeta al producto previa su comercialización. (67).

Las plantas y sus mezclas así como los preparados obtenidos de plantas en forma de extractos, liofilizados, destilados, tinturas, cocimientos o cualquiera otra preparación galénica que se presente con utilidad terapéutica, diagnóstica o preventiva seguirán el régimen de las fórmulas magistrales, preparados oficinales o especialidades farmacéuticas, según especificidades que reglamentariamente se establezcan. (8).

1.5.1. DENTÍFRICO

El dentífrico está compuesto por distintos agentes, de los cuales la mayoría son agua, humectantes (75%) y limpiadores (20%); en cuanto a sus ingredientes activos las fórmulas varían, pues algunas contienen sustancias que evitan la acumulación de depósitos blandos de comida en los dientes (mismos que al endurecerse forman el sarro o depósito de color amarillo que se adhiere sobre la superficie), mientras que otras ayudan a eliminar manchas. (49).

Entre los componentes activos tenemos:

- a) **Flúor (fluoruro sódico)**. Protege los dientes endureciendo la superficie exterior del esmalte e inhibe la actividad de la placa dentobacteriana; no elimina la caries si se encuentra ya establecida.
- b) **Cloruro de estroncio, nitrato de potasio**. Protege la parte inferior de la dentadura bloqueando conexiones nerviosas.
- c) **Peróxido de hidrógeno o de urea**. Su función es blanquear la dentadura eliminando algunas manchas del esmalte, pero su uso prolongado puede causar irritación de encías y sensibilidad acentuada.
- d) **Pirofosfato de sodio**. Se adhiere a la superficie del diente y evita la formación de sarro sobre la encía, su uso prolongado causa sensibilidad.
- e) **Bicarbonato de sodio**. Limpia la superficie del diente, su empleo excesivo genera irritación.
- f) **Triclosán**. Elimina las bacterias causantes de padecimientos en encías, no la reduce cuando ya se encuentra establecida. (39).

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO

La presente investigación se desarrolló en: Laboratorio de Fitoquímica y de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. RECURSOS MATERIALES

2.2.1. MATERIAL VEGETAL Y BIOLÓGICO

Extractos fluidos vegetales

Extracto fluido de Arrayan (*Myrcianthes rhopaloides*)

Extracto fluido de Pumín (*Salvia squalens*)

Cepas nativas de microorganismos

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Streptococcus pyogenes

Candida albicans

2.2.2. EQUIPOS

Nº	DESCRIPCIÓN	Nº	DESCRIPCIÓN
1	Autoclave FEDEGARI	6	Rotavapor (BUCHI)
2	Balanza analítica PW.MOD.PW.214	7	Estufa (FANEN)
3	Refrigeradora (DUREX)	8	Mufla TDM SAE 1010
4	Cámara de flujo laminar (ESCO)	9	Baño María (MLW)
5	Potenciómetro de mesa pH (-2 A 16 /0,001) /MV		

2.2.3. REACTIVOS

Nº	MATERIAL
1	Agua destilada
2	Acido clorhídrico 32% purís (Merck / 1.00313.2500)
3	Ácido sulfúrico 95-98% purís (Merck / 1.00713.2500)
4	Etanol 96% purís (Merck / 1.00971.1000)
5	Eter dietílico purís (Merck / 1.00926.5000)
6	Cloroformo reag. (Merck / 1.59129.0500)
7	Vainillina (Merck / 8.18718.0100)
8	Sulfato de Magnesio (Merck / 1.05886.0500)
9	Carbonato de Sodio (Merck / 1.96395.0500)
10	Cloruro de Sodio (Merck / 1.06404.0500)
11	Glicerina (Merck / 1.04092.2500)
12	Cloruro Férrico (Merck / 8.03945.0500)
13	Glicerina (Merck / 1.04092.2500)
14	Cloruro Férrico (Merck / 8.03945.0500)
15	Sulfato Férrico (Merck / 1.03965.0500)
16	Hidróxido de Sodio (Merck / 1.06498.0500)
17	Anhídrido acético para análisis (Merck / 1.00042.1000)
18	Alcohol n-amflico para análisis (Merck / 1.00975.1000)
19	Cloruro de bario dihidrato (Merck / 1.01719.0500)
20	Suero fisiológico 0,85%
21	Tartrato de Sodio y Potasio (Merck / 1.08087.0500)
22	Agar Saboraud (Merck / 1.05438.0500)
23	Agar Base Sangre (Merck / 1.10886.0500)
24	Agar Manitol Salado (Merck / 1.05469.0500)
25	Agar EMB según Levine (Merck / 1.01342.0500)
26	Agar Mueller Hinton (Merck / 1.05437.0500)
27	Agar Plate Count (Merck / 1.05463.0500)
28	Agar Cerebro Corazon (Merck / 1.13825.0500)
29	Agar Kligler (Merck / 1.03913.0500)
30	Agar Citrato según Simmons (Merck / 1.02501.0500)
31	Agar MacCONKEY (Merck / 1.05465.0500)
32	Caldo Soya Triptica (Merck / 1.05459.0500)

2.2.4. MATERIALES DE LABORATORIO

N°	Material	N°	Material
1	Asas	16	Espátula
2	Balón esmerilado de 500mL	17	Gradilla
3	Matraz Erlenmeyer 250mL	18	Mechero
4	Matraz Erlenmeyer de 100mL	19	Puntas de pipeta automática
5	Cuba	20	Papel cromatográfico
6	Pipetas graduadas de 1mL	21	Pad Millipore
7	Pipetas graduadas de 5mL	22	Papel filtro
8	Pipetas graduadas de 10mL	23	Soporte universal
9	Vasos de Precipitación de 100mL	24	Guantes estériles
10	Vasos de Precipitación de 250mL	25	Mascarilla
11	Vasos de Precipitación de 1000mL	26	Cajas petri
12	Tubos de ensayo	27	Parafilm
13	Embudos de filtración	28	Gorros quirúrgicos
14	Varillas de agitación	29	Hilo
15	Refrigerantes	30	Reverbero eléctrico

2.3. FACTORES DE ESTUDIO

Los factores que intervinieron directamente en el estudio fueron los siguientes:

TABLA N°11. FACTORES DE ESTUDIO APLICABLES A ESTA INVESTIGACIÓN

FACTOR	NIVEL
A	Va1
	Va2
	Va3
B	Vb1
	Vb2
	Vb3

Va1:1000mg/mL, Va2:750mg/mL, Va3:500mg/mL de A (Extracto fluido de Arrayán); Vb1:1000mg/mL, Vb2:750mg/mL, Vb3:500mg/mL de B (Extracto fluido de Pumín)

2.4. UNIDAD EXPERIMENTAL O DE ANÁLISIS

Se utilizó el extracto fluido de Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*) y Salvia (*Salvia squalens*), los cuales fueron analizados por separado en tres concentraciones diferentes para

evidenciar su actividad antimicrobiana por medio de pruebas de difusión en discos, en base a sus resultados se probó su efecto combinado frente a un inóculo de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*, y sus respectivas cepas de referencia ATCC, que se utilizaron para una comparación relativa del análisis.

2.5. METODOLOGÍA

2.5.1. DROGA VEGETAL CRUDA Y EXTRACTOS FLUIDOS

2.5.1.1. RECOLECCIÓN DE DROGA VEGETAL

La recolección de las drogas vegetales, se realizó en Riobamba, Provincia de Chimborazo; de acuerdo a las siguientes coordenadas: Arrayán: latitud de S 7°61.336, longitud de W 98°13.039 y altura de 2760msnm; Pumín: latitud de S 7°61.351, longitud de W 98°13.051 y altura de 2734msnm.

2.5.1.2. PRUEBAS PARA CONTROL DE CALIDAD DE DROGA CRUDA

2.5.1.2.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

En el análisis macroscópico de las hojas de Arrayan (*Myrcianthes rhopaloides*) y Pumín (*Salvia squalens*), se consideraron las siguientes características: Forma, Textura, Superficie, color, olor, dimensiones, condición, peculiaridades. MIRANDA (1996) (43).

2.5.1.2.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE LAS HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

a. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se pesó $2\pm 5 \times 10^{-4}$ g de hojas de Arrayán y Pumín por separado en dos cápsulas de porcelana previamente taradas y luego fueron sometidas a 105°C en una estufa de aire caliente durante 2 horas. (56).

b. DETERMINACION DE CENIZAS

Se pesó individualmente $2\pm 5 \times 10^{-4}$ g de hojas de Arrayan y Pumín en crisoles tarados, fueron sometidos a incineración en la mufla a 700°C de temperatura, durante 2 horas. (56).

c. DETERMINACIÓN DE CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO

A las cenizas totales se adicionó de 2-3 mL de ácido clorhídrico al 10%, se tapó con un vidrio reloj y se hirvió durante 10 min, posteriormente se lavó con 5 mL de agua caliente y se filtró, lavándose nuevamente con ácido nítrico, finalmente se agregó 2 gotas de nitrato de plata 0,1M, fue sometido a la mufla a una temperatura de 700°C - 750°C durante 2 horas. (56).

d. DETERMINACIÓN DE CENIZAS SOLUBLES EN AGUA

A las cenizas totales obtenidas, se adicionaron 15 a 20 mL. de agua, se tapó y se hirvió durante 5min, se filtró y se carbonizó sobre el crisol tarado lo cual fue llevado a la mufla a 700°C durante 2 horas. (56).

2.5.1.2.3. PROCESAMIENTO DE EXTRACTOS FLUIDOS VEGETALES

a. PREPARACIÓN DE EXTRACTO FLUIDO:

La droga vegetal, luego de trituradas las hojas se transfirió a un recipiente, en el cual se humedeció con un volumen exacto de alcohol potable 96°, se dejó reposar durante 30 min asegurando la absorción del alcohol; se vertió sobre un percolador, cuyo orificio de salida se encontraba cubierto por algodón, se añadió alcohol 96° hasta que esté completamente cubierto sin sobrepasar una concentración de 1:1, es decir 1000g de droga vegetal: 1000mL de alcohol, recirculando el volumen obtenido constantemente; el extracto fluido obtenido, fue embasado en un recipiente de vidrio color ámbar, y bajo refrigeración. (33).

b. PRUEBAS DEL CONTROL DE CALIDAD DE EXTRACTOS FLUIDOS

Para la determinación de características de control de los extractos fluidos de Arrayan y Pumín se realizaron los siguientes ensayos: determinación de requisitos organolépticos, densidad relativa, índice de refracción, pH.

c. TAMIZAJE FITOQUIMICO

Este ensayo se realizó para la identificación de metabolitos secundarios en las drogas vegetales, su metodología fue descrita por LOCK y MIRANDA (1996). (33, 43).

ENSAYO	METABOLITO
Dragendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Wagner	Alcaloides
Baljet	Lactonas
Borntrager	Quinonas
Lieberman-Buchard	Triterpenos y/o esteroides
Catequinas	Catequinas
Resinas	Resinas
Fehling	Azucares Reductores
Espuma	Saponinas
Cloruro Férrico	Compuestos Fenólicos / Taninos
Shinoda	Flavonoides
Principios Amargos	Aceites Esenciales
Sudan III	Grasas

d. CROMATOGRAFIAS DE CAPA DELGADA (TLC) DE LOS EXTRACTOS

FLUIDOS DE PUMÍN (*Salvia squalens*) Y ARRAYAN (*Myrcianthes rhopaloides*)

- CROMATOGRAFÍA PARA ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN EL EXTRACTO FLUIDO DE PUMÍN Y ARRAYÁN

Se realizó una cromatografía en capa delgada para identificar aceites esenciales en los extractos fluidos de salvia y pumín, según WAGNER (79)., en las siguientes condiciones:

Fase Móvil: Tolueno: acetato de etilo (95:5)

Revelador: Anisaldehído-ácido sulfúrico.

Soporte: Silica Gel 60 F 254 (Merck / 1.11846.0001)

- **CROMATOGRAFÍA PARA FLAVONOIDES PRESENTES EN
EXTRACTOS FLUIDOS DE PUMÍN Y ARRAYÁN**

Se realizó una cromatografía en capa delgada para identificar flavonoides según WAGNER (79), en las siguientes condiciones:

Fase Móvil: n-butanol: ácido acético: agua 20:5:25

Revelador: tricloruro de aluminio al 5 % en etanol

Soporte: Silica Gel 60 F 254 (Merck / 1.11846.0001)

**2.5.2. RECOLECCIÓN, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS
BACTERIANAS NATIVAS IMPLICADAS EN INFECCIONES
PERIODONTALES CONFIRMADAS**

2.5.2.1. RECOLECCION DE MUESTRAS DE SALIVA

En el Hospital Provincial Docente de la Provincia de Chimborazo se recolectó 20 muestras de saliva de pacientes voluntarios con infecciones periodontales ratificadas que conformaron el Pool Salival.

2.5.2.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES EN MEDIOS SELECTIVOS.

De las muestras obtenidas de saliva, según LOPEZ(1993) (34)., se aislaron e identificaron los microorganismos presentes en base a sus características macro y micromorfológicas en medios selectivos requeridos: Agar Manitol Salado para diferenciación de *Staphylococcus aureus*, Agar EMB y Mac Conkey para diferenciación de *Escherichia coli*; Agar Sangre y Agar EMB para diferenciación de *Streptococcus pyogenes*, Agar Sabouraud para diferenciación de *Candida albicans* se confirmó su aislamiento a través de pruebas bioquímicas específicas y tinción Gram, de acuerdo a SACSAQUISPE (2002). (61).

2.5.3. PRUEBAS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos fluidos de las especies vegetales *Myrcianthes rhopaloides* y *Salvia squalens* frente a cepas nativas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* obtenidas del pool de saliva, se aplicó un diseño experimental, en el cual se comparó la capacidad de los extractos fluidos para inhibir el crecimiento de los microorganismos seleccionados a través de la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana

2.5.3.1. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN POR SEPARADO.

a. PREPARACIÓN DE SENSIDISCOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

Se preparó diluciones a una concentración de 1000mg/mL, 100mg/mL y 10mg/mL de extracto fluido de las drogas vegetales en estudio por separado, cada una se vertió en una caja petri estéril que contenía un pad de 4,5cm para su posterior secado a 40°C en estufa de aire caliente, el disco seco se procedió a perforar para obtener discos individuales de 6mm de diámetro. (12).

b. REACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES

Cada microorganismo fue reactivado antes de 18 a 24 horas en Caldo Soya Trípica previa su aplicación en cada prueba. (12).

c. DIFUSION EN DISCO POR SEPARADO DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

Se procedió a la inoculación de las suspensiones de las cepas nativas reactivadas de cada una de los microorganismos implicados en el estudio, ajustadas al estándar Mc Farland, con

un hisopo estéril sobre la superficie de MHA, donde inmediatamente, se aplicó sensidiscos de 1000mg/mL, 100mg/mL y 10mg/mL de cada extracto fluido, se incubó las placas por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, para su posterior lectura de zonas de inhibición, cada análisis de los diferentes microorganismos implicados en el estudio, se realizó por nonuplicado. (12).

d. MACRODILUCIÓN EN CALDO CON EXTRACTO FLUIDO DE ARRAYÁN Y PUMÍN PARA CMI Y CMB

CMI: De los extractos fluidos en estudio se prepararon independientemente diluciones seriadas 1:2 en el rango de 1000mg/mL a 0,06mg/mL, dentro de los 15min. Siguiendo, a cada tubo se adicionó 1mL del inóculo de $2,33 \times 10^6$ ufc/mL., se emplearon controles de crecimiento y esterilidad cada uno constaron de 1mL del inóculo y 1mL extracto fluido respectivamente con 1mL de caldo cada uno, todos los tubos se incubaron a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 16 a 20 horas.

CMB: De cada uno de los tubos del ensayo de CMI al cabo de 20 horas de incubación se tomó inóculos que fueron estriados en placas de agar, que se incubaron a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. (12). Cuando se inocula 10 μL de alícuota al caldo se usa una tabla de valores de rechazo y se anota el número de colonias permitidas en base al tamaño final del inóculo. (ver ANEXO N° 4)

2.5.3.2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN COMBINADO.

a. TÉCNICA DE TABLERO PARA POSIBLES COMBINACIONES

Las combinaciones de extractos fluidos de Arrayán (A) y Pumín (B) se obtuvieron al colocar en el eje X de un tablero las concentraciones de 1000mg/mL, 750mg/mL y 500mg/mL del antimicrobiano A y en el eje Y las concentraciones del Antimicrobiano B es decir 1000mg/mL, 750mg/mL y 500mg/mL. (10). Según la TablaN°12, se prepararon los sensidiscos respectivos de acuerdo a la técnica descrita anteriormente.

TABLA N°12: TABLERO DE COMBINACIONES PARA COMBINACIONES

		X		
		1000mg/mL	750 mg/mL	500 mg/mL
Y	1000 mg/mL	2000 mg/mL	-	-
	750 mg/mL	-	1500 mg/mL	-
	500 mg/mL	-	-	1000 mg/mL

Fuente: CATON R. (10).

b. DIFUSION EN DISCO DE EXTRACTOS FLUIDOS COMBINADOS

Se estandarizó el inóculo de la suspensión de la cepa nativa reactivada previamente y con un hisopo estéril se procedió a la inoculación sobre la superficie de MHA, donde inmediatamente, se aplicó sensidiscos de concentraciones combinadas de los extractos de acuerdo a la técnica de tablero para actividad combinada de antimicrobianos, se incubó las placas invertidas por 24 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, para su posterior lectura de zonas de inhibición,

cada análisis de los diferentes microorganismos implicados en el estudio, se realizó por nonuplicado.

Se examinó cada placa para medir el diámetro de inhibición, para determinar el tipo de interacción existente de acuerdo a las diferentes combinaciones de extractos fluidos; donde se consideró: sinergia: el diámetro de inhibición total es mayor a la suma de dos halos de inhibición por separado; antagonismo: presenta un crecimiento visible incluso en donde se esperaba zona de inhibición; adición o indiferencia: el diámetro de inhibición es la suma de dos halos de inhibición por separado. (10).

2.5.4. INCORPORACIÓN DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN EN LA ELABORACIÓN DE UN DENTÍFRICO

A una formulación preestablecida de un dentífrico Tabla N° 13, (BERDONCES 1995) (6)., se incorporaron los extractos fluidos de arrayan y pumín en concentraciones óptimas en base a su actividad antimicrobiana combinada y características sensoriales aceptables.

TABLA N°13: FORMULACIÓN DE UN DENTÍFRICO EN FUNCIÓN A SUS PORCENTAJES Y FUNCIÓN

Nombre de ingrediente	Porcentaje %	Función
Extractos fluidos	0,2	Principios activos, aromatizante
Carbonato de calcio	30	Abrasivo
Lauryl sulfato de sodio	1,8	Detergente
Glicerina	20	Humectante
Cmc	1,8	Espesante
Sacarina	2,5	Edulcorante
Aceite mineral	4	Lubricante
Agua desionizada	39,7	Diluyente

Fuente: Verónica Boderó

2.5.4.1. CONTROL DE CALIDAD DEL DENTÍFRICO

Su calidad se determinó en base a los siguientes ensayos: sensoriales y físicos como grumosidad, extensibilidad. SHANGRAW, R.F. (1994) (67).

2.6. DISEÑO EXPERIMENTAL

2.6.1. TRATAMIENTO DE ACTIVIDAD “*in vitro*”

TABLA N°14: TRATAMIENTOS REALIZADOS DE CADA EXTRACTO FLUIDO POR SEPARADO Y EN COMBINACION PARA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

DETERMINACIÓN	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
Va	Volumen de Extracto fluido de Arrayan frente al microorganismo
Vb	Volumen de Extracto fluido de Pumín frente al microorganismo

COMBINACIONES	ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
Va1Vb1	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va1Vb2	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va1Vb3	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va2Vb1	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va2Vb2	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va2Vb3	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va3Vb1	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va3Vb2	Mezcla de extractos frente al microorganismo
Va3Vb3	Mezcla de extractos frente al microorganismo

Va1Vb1= 1000:1000; Va1:Vb2 = 1000:750; Va1:Vb3 = 1000:500; Va2:Vb1 = 750:1000; Va2:Vb2 = 750:750; Va2:Vb3 = 750:500; Va3:Vb1 = 500:1000; Va3:Vb2= 500:750; Va3:Vb3 = 500:500mg/mL de los extractos fluidos combinados de Arrayan y Pumin

Se aplicó el diseño anterior por nonuplicado para cada microorganismo seleccionado:

Escherichia coli

Staphylococcus aureus

Streptococcus pyogenes

Candida albicans

2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las pruebas de sensibilidad de cepas nativas aisladas de un pool de saliva implicadas en infecciones periodontales confirmadas, frente a agentes antimicrobianos presentes en los extractos fluidos en estudio, fueron analizados mediante la Prueba T-Student para dos muestras independientes, con la finalidad de identificar cual de los dos extractos fluidos mostraron la mejor actividad frente a cada microorganismo; los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad de extractos combinados fueron analizados mediante Anova y Tukey al 5% , con lo cual se estableció una comparación de efectividad entre cada una de las combinaciones de los extractos fluidos en estudio.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias a la influencia de datos etnobotánicos se culminó el trabajo experimental, que incluyó el estudio farmacognóstico de las drogas vegetales seleccionadas, su actividad antimicrobiana combinada “*in vitro*” y su aplicación en un dentífrico, obteniendo los resultados que se detallan a continuación:

3.1. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO DE ARRAYAN (*Myrcianthes rhopaloides*) Y PUMÍN (*Salvia squalens*)

La exploración de especies vegetales seleccionadas comprobó la presencia de saponinas, flavonoides, azúcares reductores, lactonas, quinonas, taninos; metabolitos responsables de las propiedades terapéuticas atribuidas a estas especies. (KINTNZIOS 2005) (30)., (LIZCANO 2008) (32).; Sobre el Pumín no existen publicaciones acerca del estudio farmacognóstico por lo que este sería el primer estudio realizado en el país.

3.1.1. CALIDAD DE DROGA CRUDA DE ARRAYÁN Y PUMÍN

La calidad del producto final es uno de los motivos por lo que se realizó esta prueba, sus resultados depende, de varios factores para conservar íntegramente las propiedades terapéuticas existentes.

3.1.1.1. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*): hoja peciolada acuminada, entera ligeramente elíptica, de olor aromático, verde oscura brillante en la cara superior y verde pálido en la inferior de textura lisa – coriácea de 3,2cm de largo y 1,8cm de ancho.

PUMÍN (*Salvia squalens*): hoja aguda, entera ligeramente truncada, sentada y palminervia, olor aromático verde parduzco de 1,5cm largo por 0,8cm de ancho, de textura membranosa.

3.1.1.2. CONTROL FÍSICO-QUÍMICO DE LAS HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

a. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

El material vegetal una vez cortado, experimenta alteraciones que influyen sobre la actividad terapéutica, estos cambios se deben a reacciones de naturaleza enzimática que se producen en presencia de agua, acelerando los procesos de putrefacción y enmohecimiento. Por tanto, el contenido de agua en la droga influye sobre su calidad a la vez es importante conocer este valor para los procesos de secado.

TABLA N°15: POCENTAJE DE HUMEDAD CONTENIDO EN LAS HOJA DE ARRAYÁN Y PUMÍN RESPECTIVAMENTE

	%Humedad media	Desviación Estándar
ARRAYÁN	9,81	± 0,0173
PUMÍN	8,12	± 0,00577

m1: Muestra 1(g); m2: Muestra 2 (g); m3: Muestra 3 (g)

Fuente: Verónica Boderó

La Tabla N° 15, corroboró que las drogas vegetales se encontraron dentro del 10% límite establecido de contenido de humedad de acuerdo a la REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA (56)., valor que indica buenas condiciones de almacenamiento previniendo proliferación microbiana y asegurando la mantención de las propiedades terapéuticas del material vegetal.

b. DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN ÁCIDO CLORHÍDRICO DE LA DROGA CRUDA DE ARRAYÁN Y PUMÍN

El ensayo realizado permite conocer si el material vegetal tiene un exceso de materia terrosa, arcillosa o arenosa.

TABLA N°16. DETERMINACION DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN ACIDO CLORHIDRICO DE LA DROGA CRUDA ARRAYAN Y PUMÍN

	% C. totales (mg)	% C. sol. agua (mg)	% C. ins. HCl (mg)
ARRAYAN	9,82	8,54	0,97
PUMÍN	8,72	7,32	1,18

% C. totales: cenizas totales; % C.sol.agua: cenizas solubles en agua; % C.ins.HCl: cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Los resultados expresados en la Tabla N°16, indicaron que los valores se encuentran aceptables para este tipo de muestra, de acuerdo a la REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA (56)., los límites permitidos de cenizas totales son hasta 10%, lo que da lugar a garantizar la calidad de recolección de la droga vegetal a estudiarse.

3.1.2. CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

Las variables analizadas fueron escogidas por ser estas las más representativas en la conservación y actividad de un extracto fluido.

TABLA N°17. DETERMINACIÓN ORGANOLÉPTICA, DENSIDAD RELATIVA, INDICE DE REFRACCIÓN Y pH DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

	ARRAYÁN	PUMÍN
OLOR	Aromático	Aromático
COLOR	Verde intenso	Ámbar intenso
ASPECTO	Transparente, homogéneo	Transparente, homogéneo
ρ^{25}	1,0094	1,0023
η^{20}	1,254	1,362
pH	4,69	5,72

Fuente: Verónica Boderó

Los resultados revelaron en ambos casos características típicas de un extracto fluido, entre las cuales se encuentra una ligera acidez, la cual favorece: a) conservación del dentífrico elaborado, previniendo el desarrollo bacteriano a largo plazo, b) absorción óptima a nivel celular de los compuestos terapéuticos, c) su aromaticidad corroboró la presencia de aceites esenciales con potenciales propiedades antibacteriales y anestésicas.

3.1.2.1. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Una de las etapas más representativas en el estudio farmacognóstico es la determinación cualitativa de grupos químicos que ayudan a comprender su fisiología y bioquímica, logrando su mejor aprovechamiento con fines científicos y medicinales.

TABLA N°18. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LA DROGA CRUDA DE ARRAYÁN Y PUMÍN.

ENSAYOS	INDICADORES	ARRAYÁN	PUMÍN
Dragendorff /Alcaloides	Opalescencia(+) Turbidez definida(++) Precipitado Naranja (+++)	+	+
Mayer /Alcaloides	Opalescencia(+) Turbidez definida(++) Precipitado Naranja (+++)	-	-
Wagner / Alcaloides	Opalescencia(+) Turbidez definida(++) Precipitado Naranja (+++)	++	+++
Baljet / Lactonas	Color rojo (++) Precipitado (+++)	+++	++
Borntrager / Quinonas	Rosado (++) Rojo (+++)	+++	++
Liberman-Buchard/triterpenos	Rosado – azul Intenso – visible Oscuro – negro (+)	+++	++
Catequinas	Mancha verde carmelita/UV	-	+
Resinas	Precipitado (+)	-	-
Fehling/Azucares Reductores	Color/precipitado rojo ladrillo (+)	+++	+++
Espuma / Saponinas	Espuma persistente 2' (+)	+++	+++
Cloruro Férrico / Taninos	Rojo - Vino (+), Verde intenso (+) Azul (+)	Azul	Verde
Shinoda / Flavonoides	Amarillo, naranja o rojo (+)	+++	+++
Principios Amargos	Sabor amargo	+	+
Sudan III/ Grasas	Gotas de color rojo	++	+

(-) Ausencia; (+) Posible presencia; (++) Presencia confirmada; (+++) Presencia de cantidad suficiente

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo a la Tabla N°18, donde se exponen los compuestos activos encontrados: en Pumín (*Salvia squalens*) coinciden con los principios activos descritos por (VARGAS 1995), en su estudio de *Salvia officinalis* donde se reveló la presencia de taninos, esencias aromáticas, triterpenos y compuestos fenólicos entre los más importantes. (75).

El tamizaje fitoquímico del Extracto fluido de Arrayán evidenció la presencia de flavonoides, azúcares reductores, taninos, lactonas, triterpenos y esteroides, concordando con los resultados de (CERRUTTI T. 2000), quien analizó material vegetal proveniente de otra latitud geográfica. (14).

3.1.2.2. CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC) DE LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

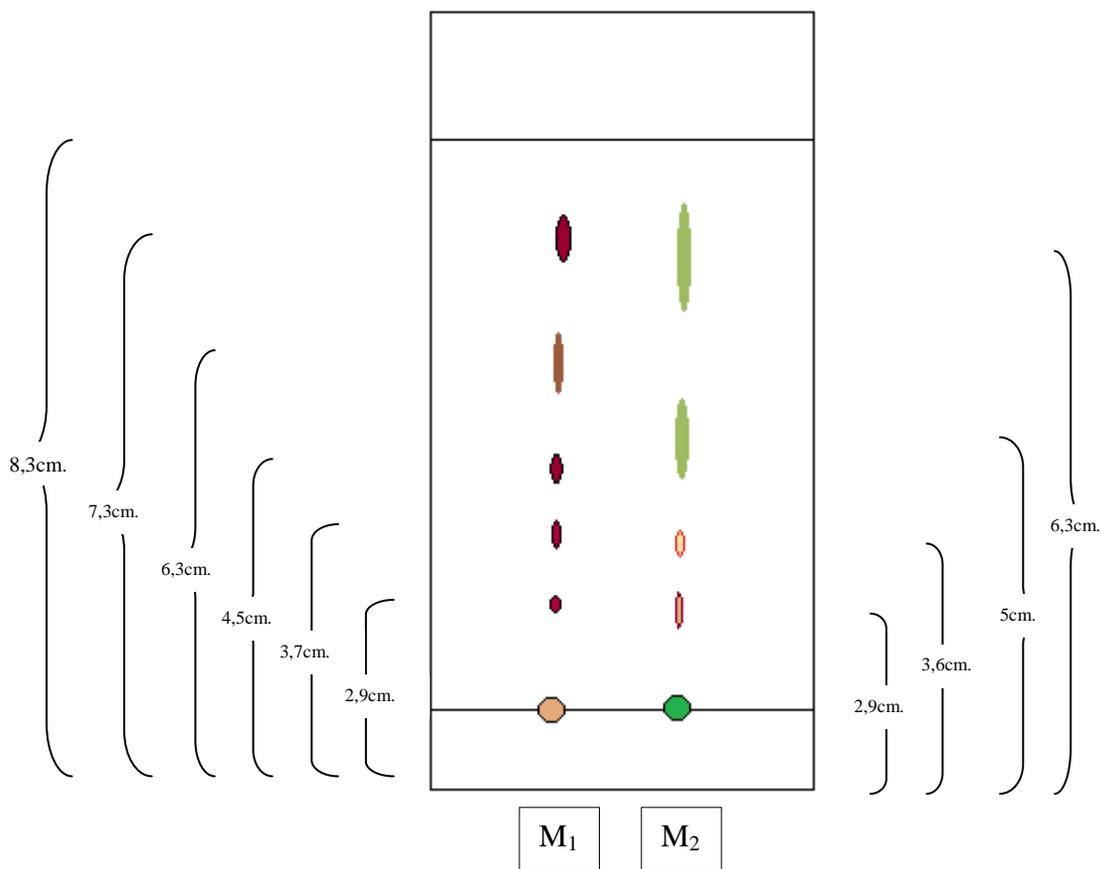
Es uno de los requisitos exigidos para la evaluación de medicamentos herbarios, la determinación de un perfil cromatográfico contribuye a caracterizar la droga vegetal que se utiliza para la elaboración de un producto en cuestión.

a. CROMATOGRAFÍA PARA ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN EL EXTRACTO FLUIDO DE PUMÍN (*Salvia squalens*) Y ARRAYÁN (*Myrcianthes rhopaloides*)

Se realizó una cromatografía en capa delgada para identificar aceites esenciales en los extractos fluidos de Pumín (*Salvia squalens*) y Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*), el cromatograma mostró las características del Gráfico N°1 de acuerdo a las siguientes

condiciones: **Fase Móvil:** Tolueno: acetato de etilo (95:5); **Revelador:** Anisaldehído-ácido sulfúrico; **Soporte:** Silica Gel 60 F 254 (Merck / 1.11846.0001) (79)., y los resultados se muestran en la Tabla N° 19.

GRAFICO N°1. CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA ACEITES ESENCIALES DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS



M1.- Residuo del extracto fluido de Pumín (*Salvia squalens*)

M2.- Residuo del extracto fluido de Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*)

TABLA N°19: RF DE BANDAS DE ACEITES ESENCIALES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.

	PUMÍN		ARRAYÁN	
	Rf teórico	Rf práctico	Rf teórico	Rf práctico
Rf1	0,34-0,39 (Borneol)	0,35	0,33-0,37(Linalol)	0,35
Rf2	0,44-0,47 (1,8Cineol)	0,45	0,40-0,45 (Timol)	0,43
Rf3	0,53-0,56 (Anetol)	0,54	0,50-0,58(Eucaliptol)	0,60
Rf4	0,61-0,64(α - β tujona)	0,67	0,67-0,73(Citral)	-
Rf5	0,74-0,78 (Viridiflorol)	-	0,78-0,80(Citronelal)	0,76
Rf6	0,84-0,87(Mirceno)	0,88	0,83-0,87(α - β pineno)	-

Fuente: valores de intervalos de rf para Aceites esenciales de Salvia y Arrayan.^{12,52.}

Rf = distancia de la sustancia/frente de la fase móvil; Rf1: banda de rf N°1; Rf2: banda de rf N°2; Rf3: banda de rf N°3; Rf4: banda de rf N°4; Rf5: banda de rf N°5; Rf6: banda de rf N°6

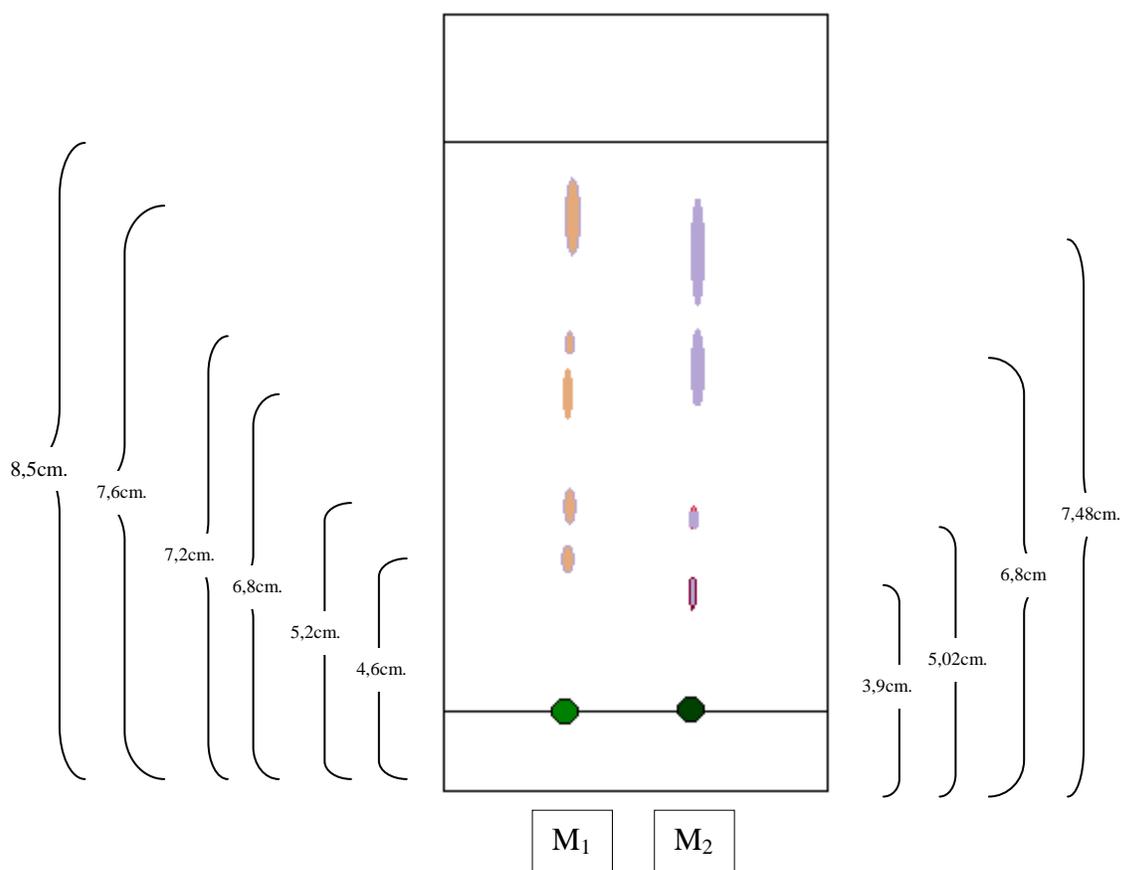
El cromatograma obtenido para aceites esenciales, reveló un total de 5 y 4 bandas para los extractos fluidos de Pumín y Arrayan respectivamente, además se confirmó que sus rf prácticos caen dentro de los rangos teóricos expuestos por SANCHEZ (2005), en su estudio acerca de la composición de *Salvia officinalis*. (64). y por GARCIA (2002) en su publicación acerca de las Fracciones extractables del Arrayan. (23).

b. CROMATOGRAFIA PARA FLAVONOIDES PRESENTES EN EXTRACTOS FLUIDOS DE PUMÍN (*Salvia squalens*) Y ARRAYAN (*Myrcianthes rhopaloides*)

Se realizó una cromatografía en capa delgada para identificar flavonoides en los extractos fluidos de Pumín (*Salvia squalens*) y Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*), el Gráfico N°2 mostró las características del cromatograma obtenido de acuerdo a las siguientes condiciones: **Fase Móvil:** n-butanol: ácido acético: agua 20:5:25; **Revelador:** tricloruro de

aluminio al 5 % en etanol; **Soporte:** Silica Gel 60 F 254 (Merck / 1.11846.0001) (79)., y los resultados se muestran en la Tabla N° 20.

GRAFICO N°2. CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA FLAVONOIDEOS DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS



M1.- Residuo del extracto fluido de Pumín (*Salvia squalens*)

M2.- Residuo del extracto fluido de Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*)

TABLA N°20: RF DE BANDAS DE FLAVONOIDES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN.

	PUMÍN		ARRAYÁN	
	Rf teórico	Rf práctico	Rf teórico	Rf práctico
Rf1	0,54-0,57(Rutina)	0,54	0,27-0,37 (Luteolina)	-
Rf2	0,60-0,62 (Ac.Clorogénico)	0,61	0,39-0,46 (Miricetina)	0,47
Rf3	0,78-0,80 (Cinarina)	0,79	0,48-0,51(Apigenina)	-
Rf4	0,82-0,85(Ác.Rosmarínico)	0,85	0,53-0,59 (Rutina)	0,59
Rf5	0,85-0,89 (Quercetina)	-	0,71-0,82(Isoquercitrina)	0,80
Rf6	0,90-0,94 (Acido Cafeico)	0,90	0,84-0,93 (Quercetina)	0,88

Fuente: valores de intervalos de rf para Aceites esenciales de Salvia y Arrayan.^{12,52.}

Rf = distancia de la sustancia/frente de la fase móvil; Rf1: banda de rf N°1;Rf2: banda de rf N°2; Rf3: banda de rf N°3;Rf4: banda de rf N°4; Rf5: banda de rf N°5; Rf6: banda de rf N°6

El perfil cromatográfico del extracto fluido de Pumín y Arrayan, mostraron respectivamente, 5 y 4 bandas con manchas oscuras de diferente intensidad, concordando con lo aseverado en sus publicaciones con SANCHEZ (64)., y GARCIA (23)., a los flavonoides se les atribuye características terapéuticas importantes, entre las cuales se puede mencionar: antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas, antivirales, antifúngicos y antibacteriales, propiedades útiles para su uso a nivel odontológico.

3.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

3.2.1. CEPAS BACTERIANAS

3.2.1.1. IDENTIFICACIÓN MICROBIANA DE PATÓGENOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES.

Los aislamientos fueron recuperados en medios de cultivos selectivos, se tipificó cada uno como presuntivos en base a su macro-micromorfología, tinción Gram, posteriormente se caracterizaron mediante pruebas de metabolismo para cada microorganismo implicado.

a. *Staphylococcus aureus*

Microorganismo implicado en erupciones pustulosas agudas en la piel peribucal, en osteomielitis, se presenta después de la aparición de caries dental la cual estimula su progreso a infección peribucal intraósea, de acuerdo con BUSTOS (2006) y TORRES (2010), se constató su aislamiento e identificación de *S. aureus* del Pool de saliva inicial. (7), (74).

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *Staphylococcus aureus*

Esta bacteria observada bajo 1000x se presentó como: coco Gram positivo, no móvil, no esporulado, se encontró solo o asociado en pares, en cadenas o en racimos.

MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE *Staphylococcus aureus*

S. aureus en condiciones aerobias creció rápidamente en agar sangre (Merck / 1.10886.0500) formando colonias de color amarillo dorado con 1 a 3 mm de diámetro, produjo hemólisis a las 24 horas, formación de colonias amarillas en agar Manitol Salado (Merck / 1.05469.0500).

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE *Staphylococcus aureus*

S. aureus fue catalasa positivo, coagulasa positivo y fermentó Agar Manitol Salado (Merck / 1.05469.0500) formando colonias de color amarillo.

b. Escherichia coli

Su presencia en la placa subgingival complica el cuadro de pacientes con periodontitis, tienen la capacidad para colonizar y proliferar en la cavidad bucal, actuando como cofactores en las formas destructivas de la enfermedad periodontal induciendo septicemias y aumentando el riesgo de enfermedades cardiovasculares; se corroboró su aislamiento recuperando colonias verdes oscuras con brillo metálico características de la especie.

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *Escherichia coli*

E. coli observada bajo 1000x se presentó como bacilo recto Gram negativo, no esporulado.

MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE *Escherichia coli*

E. coli en agar EMB (Merck / 1.01342.0500) formó colonias circulares, convexas de color verde oscuro con brillo metálico; en agar MacConkey (Merck / 1.05465.0500) se presentó con colonias de color rosado.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*

E. coli fermentó glucosa, lactosa en agar Kligler (Merck/1.03913.0500), produjo indol, fue móvil en agar SIM (Merck/1.02501.0500), no hidrolizó Urea, ni utilizó citrato como fuente de carbono.

c. *Streptococcus pyogenes*

Esta bacteria es responsable de faringitis, amigdalitis y algunas formas atípicas de mucositis y gingivitis; al igual que *Streptococcus viridans*, se relaciona con la patogenia de la caries dental, motivo de gran preocupación en la práctica odontológica ya que provoca severos trastornos en la mucosa oral.

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes observada bajo 1000x (TORRES 2010) se presentó como cocos Gram positivos de 0,5 - 2 μm de diámetro, sin formar esporas, agrupados en parejas o en cadenas inmóviles. (74).

MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes en agar sangre (Merck / 1.10886.0500) formó colonias blancas transparentes, donde produjo zonas de Beta hemólisis, de 1 a 2 mm de diámetro.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes produjo beta hemólisis pronunciada, fue catalasa negativo, y presentó sensibilidad a Bacitracina 0,04UI. (CAMPONOVO 2002)⁹

d. Candida albicans

La colonización de *C. albicans* sugiere la formación de un biofilm (biopelícula) sobre las superficies dentales y mucosa bucal, causando infecciones sobre mucosas, esofagitis por cándida, candidiasis gastrointestinal, de acuerdo a lo expuesto por VELAZCO (2009) se constató el aislamiento de *C. albicans* en el pool de saliva para este ensayo. (77).

MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA DE *Candida albicans*

Levadura Gram positiva que presentó forma oval de 2 a 4 μm , con extremos redondos de 3 a 5 μm de diámetro y pseudohifas.

MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA DE *Candida albicans*

C. albicans en Agar Sabouraud (Merck / 1.05438.0500) se presentó formando colonias pequeñas de 1,5 a 2 mm de diámetro, lisas, suaves, húmedas, de color y aspecto cremoso, de consistencia blanda y rápidamente proyectó filamentos hasta la profundidad del agar. Después de 4-5 días se percibió un olor característico de levadura.

IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Candida albicans*

C. albicans fue identificada mediante un panel de pruebas bioquímicas API para Candida, el cual arrojó como resultado el número 7112 corroborando su aislamiento. (ver ANEXO N°6)

3.2.1.2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN POR SEPARADO

a. DIFUSIÓN EN DISCO POR SEPARADO DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

Los resultados de las pruebas de sensibilidad de cepas nativas aisladas de un pool de saliva proveniente de infecciones periodontales confirmadas, frente a agentes antimicrobianos presentes en los extractos fluidos en estudio, de acuerdo a los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas en cada cuadro, se planteó dos hipótesis para la realización de la Prueba T-Student para dos muestras independientes, con la finalidad de identificar cual de los dos extractos fluidos presentan la mejor actividad frente a cada microorganismo, obteniendo lo siguiente:

TABLA N°21: COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

<i>Escherichia coli</i>			
	Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (promedio)	Desviación estándar
Arrayan	1000	0	-
	100	0	-
	10	0	-
Pumín	1000	0	-
	100	0	-
	10	0	-

Fuente: Verónica Bodero

En el Tabla N°21, *E. coli* en este caso, no presentó zonas de inhibición a ninguna concentración aplicada en el estudio, lo que quiere decir que presenta resistencia a los extractos fluidos aplicados por separado

TABLA N°22: COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

<i>Staphylococcus aureus</i>			
	Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (promedio)	Desviación estándar
Arrayán	1000	7,84444444	± 0,201
	100	0	-
	10	0	-
Pumín	1000	7,06666667	± 0,1
	100	0	-
	10	0	-

Prueba t para dos muestras independientes / Prueba unilateral a la derecha:

Intervalo de confianza para la diferencia entre las medias al 95%:

Diferencia	0,750
t (Valor observado)	9,227
t (Valor crítico)	1,761
GDL	14
p-valor (unilateral)	< 0,0001
Alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es superior a 0.

Como el p-valor computado es menor que el nivel de significación alfa=0,05, se debe rechazar la hipótesis nula H0

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es menor que 0,01%.

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo a las zonas de inhibición obtenidas en el Tabla N°22, se corroboró la presencia de actividad antimicrobiana de una concentración de 1000mg/mL de los extractos fluidos

de Arrayan y Pumín por separado, confirmando estadísticamente, una mejor actividad para el extracto fluido de Arrayan frente a *S. aureus*.

TABLA N°23: COMPORTAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN

Streptococcus pyogenes

	Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (promedio)	Desviación estándar
Arrayan	1000	7,044444444	±0,053
	100	0	-
	10	0	-
Pumín	1000	7,366666667	±0,122
	100	0	-
	10	0	-

Prueba t para dos muestras independientes / Prueba unilateral a la derecha:

Intervalo de confianza para la diferencia entre las medias al 95%:

Diferencia	-0,100
t (Valor observado)	-1,414
t (Valor crítico)	1,746
GDL	16
p-valor (unilateral)	0,912
Alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es superior a 0.

Como el p-valor calculado es mayor que el nivel de significación alfa=0,05, se puede aceptar la hipótesis nula H0.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es de 91,18%.

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo a las zonas de inhibición obtenidas en la Tabla N°23, se confirmó la presencia de actividad antimicrobiana de una concentración de 1000mg/mL de los extractos fluidos

de Arrayan y Pumín por separado, ratificando estadísticamente, una mejor actividad para el extracto fluido de Pumín frente a *S. pyogenes*, ya que presentó un mayor diámetro de halo de inhibición en comparación del presentado por el extracto fluido de arrayán.

TABLA N°24: COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

Candida albicans

	Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (promedio)	Desviación estándar		
Arrayan	1000	7,95555556	± 0,101		
	100	0	-		
	10	0	-		
Pumín	1000	7	-		
	100	0	-		
	10	0	-		
Estadísticas descriptivas:					
Variable	Observaciones	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Var1	9	7,800	8,100	7,956	0,101
Var1(2)	9	7,000	7,000	7,000	0,000

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo a las zonas de inhibición obtenidas, la Tabla N° 24 confirmó la presencia de actividad antimicrobiana de una concentración de 1000mg/mL de los extractos fluidos de Arrayan y Pumín por separado, corroborando una mejor actividad para el extracto fluido de Arrayan frente a *C. albicans*, y que los diámetros presentados con para el extracto fluido de Pumín se mantienen constantes.

TABLA N°25: COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

Escherichia coli ATCC

	Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (promedio)	Desviación estándar
Arrayán	1000	0	-
	100	0	-
	10	0	-
Pumín	1000	0	-
	100	0	-
	10	0	-

Fuente: Verónica Bodero

En el Tabla N°25, *E. coli* ATCC no presentó inhibición de crecimiento microbiano a ninguna concentración de los extractos fluidos en estudio, al igual que la Tabla N°21 de *E. coli* nativa.

TABLA N°26: COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

Staphylococcus aureus ATCC

	Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (promedio)	Desviación estándar
Arrayan	1000	7	-
	100	0	-
	10	0	-
Pumín	1000	0	-
	100	0	-
	10	0	-

Estadísticas descriptivas:

Variable	Observaciones	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica
Var1	9	7	7	7	0
Var1(2)	9	0	0	0	0

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo a las zonas de inhibición obtenidas en la Tabla N°26, se confirmó la acción antimicrobiana, en una concentración de 1000mg/mL, únicamente del extracto fluido de Arrayán, ya que en este caso, el extracto fluido de pumín no inhibe crecimiento microbiano alguno.

TABLA N°27: COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

<i>Candida albicans</i> ATCC			
	Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (promedio)	Desviación estándar
Arrayan	1000	9,79	±0,145
	100	0	-
	10	0	-
Pumín	1000	7,06	±0,073
	100	0	-
	10	0	-

Prueba t para dos muestras independientes / Prueba unilateral a la derecha:

Intervalo de confianza para la diferencia entre las medias al 95%:

Diferencia	2,733
t (Valor observado)	50,478
t (Valor crítico)	1,785
GDL	12
p-valor (unilateral)	< 0,0001
Alfa	0,05

Interpretación de la prueba:

H0: La diferencia entre las medias es igual a 0.

Ha: La diferencia entre las medias es superior a 0.

Como el p-valor computado es menor que el nivel de significación $\alpha=0,05$, se debe rechazar

la hipótesis nula H0, y aceptar la hipótesis alternativa Ha.

El riesgo de rechazar la hipótesis nula H0 cuando es verdadera es menor que 0,01%.

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo a las zonas de inhibición obtenidas en la Tabla N°27, donde se mostró la presencia de actividad antimicrobiana de una concentración de 1000mg/mL de los extractos fluidos de Arrayan y Pumín por separado, confirmando estadísticamente, una mejor actividad para el extracto fluido de Arrayan en comparación con el extracto fluido de pumín, ya que presenta unos diámetros de inhibición relativamente pequeños.

b. MACRODILUCION EN CALDO CON EXTRACTO FLUIDO DE ARRAYAN Y PUMÍN PARA CMI Y CMB

De acuerdo al ensayo empleado para la determinación de la CIM, se estableció:

TABLA N°28. ENSAYO DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CIM PARA *Staphylococcus aureus* CON LOS DIFERENTES EXTRACTOS ARRAYAN Y PUMÍN

N° de frasco	POTENCIA (mg/mL)	CIM ARRAYÁN (S – R – I)	CIM PUMÍN (S – R – I)
1	1000	S	S
2	500	I	S
3	250	R	R
4	125	R	R
5	62,5	R	R
6	31,25	R	R
7	15,6	R	R
8	7,81	R	R
9	3,9	R	R
10	1,95	R	R
11	0,97	R	R
12	0,49	R	R
13	0,24	R	R
14	0,12	R	R
15	0,06	R	R
Control de crecimiento	-		
Control de esterilidad	1000	-	-

S: Sensible; I: Intermedio; R: Resistente

Fuente: Verónica Bodero

En concordancia a la Tabla N° 28, la concentración mínima inhibitoria de los extractos fluidos de Arrayán y Pumín para *Staphylococcus aureus* fueron de 250mg/mL, es decir las concentraciones más bajas de las series de diluciones en las que se evidenció crecimiento visible tras la incubación del ensayo.

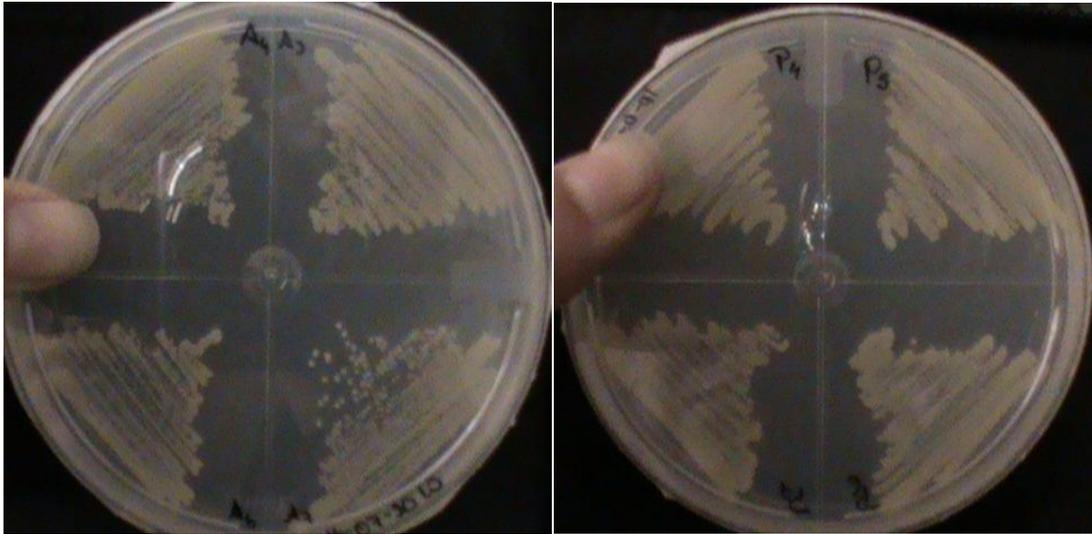
CMB: El tamaño de la población bacteriana inicial inoculado fue de $2,33 \times 10^6$ UFC/mL de caldo, donde la CMB fue establecida como la concentración más baja de agente antimicrobiano destruyó el 99,9% del inóculo inicial, tomando en cuenta este criterio, la CMB para el extracto fluido de pumín y para el extracto fluido de Arrayán fueron de 500mg/mL, en este caso coincidieron en su valor.



FOTOGRAFIA N°11. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de microdilución en caldo de Extracto fluido de Arrayan (A0, A1, A2, A3)



FOTOGRAFIA N°12. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de microdilución en caldo de Extracto fluido de Pumín (P0, P1, P2, P3)



FOTOGRAFIA N°13. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de macrodilución en caldo de Extracto fluido Arrayan A4, A5, A6, A7

FOTOGRAFIA N°14. Ensayo biológico de cada juego de frascos de prueba de macrodilución en caldo de Extracto fluido Pumin A8, A9, A10, A11

3.2.1.2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN COMBINADA

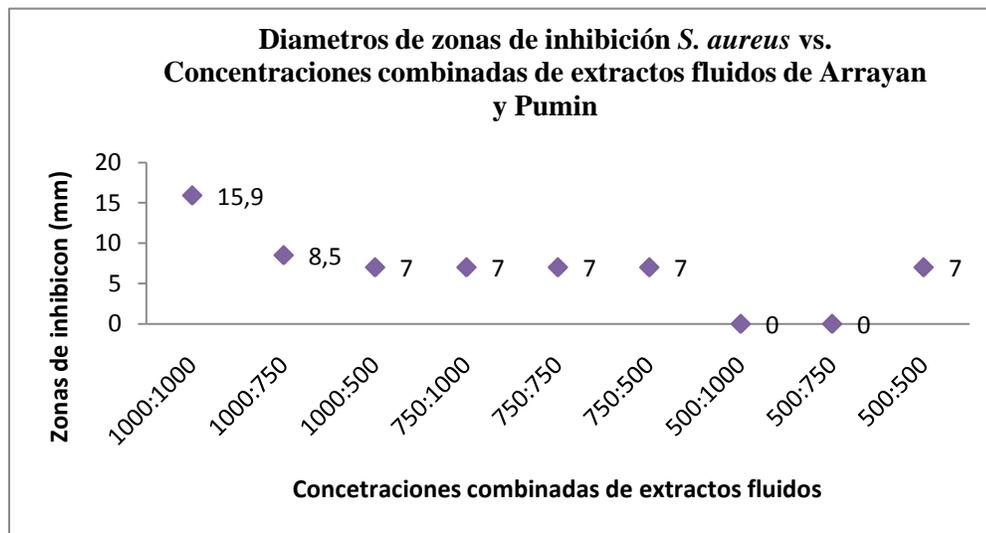
a. DIFUSION EN DISCOS COMBINADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN

La sensibilidad microbiana en cada caso, se estableció de acuerdo a los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas por el efecto de discos de extractos fluidos de Arrayán y Pumín combinados frente a cepas nativas aisladas de infecciones periodontales confirmadas, de acuerdo a este contexto se obtuvieron los siguientes resultados:

TABLA N°29. COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

<i>Staphylococcus aureus</i>		
[] del disco (mgA : mgP)	Diámetro de zona de inhibición (promedio)	Desviación estándar
1000:1000	15,9	±0,112
1000:750	8,5	±0,393
1000:500	7	-
750:1000	7	-
750:750	7	-
750:500	7	-
500:1000	0	-
500:750	0	-
500:500	7	-

GRAFICO N°3: DIAMETROS DE ZONAS DE INHIBICION *S. aureus* vs. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN



Análisis de la varianza:

Fuente	GDL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	8	1603,329	200,416	10768,627	< 0,0001
Error	72	1,340	0,019		
Total	80	1604,669			
R²				0,999	

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco, R²: coeficiente de correlación

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo al análisis de varianza, estableció que el diámetro de las zonas de inhibición microbiana, presentaron una correlación muy buena, debido a que no mostró variación significativa entre las repeticiones de los ensayos; sin embargo estos diámetros variaron entre pruebas, esto demuestra estadísticamente que al menos una de las concentraciones es diferente de las demás.

TABLA N°30: ANÁLISIS DE DIFERENCIAS ENTRE CATEGORIAS TEST DE TUKEY PARA *Staphylococcus aureus*

Intervalo de confianza de 95%		
Categoría	Media	Grupo
1000:1000	15,900	A
1000:750	8,533	B
1000:500	7,000	C
500:500	7,000	C
750:1000	7,000	C
750:500	7,000	C
750:750	7,000	C
500:750	0,000	D
500:1000	0,000	D

Fuente: Verónica Bodero

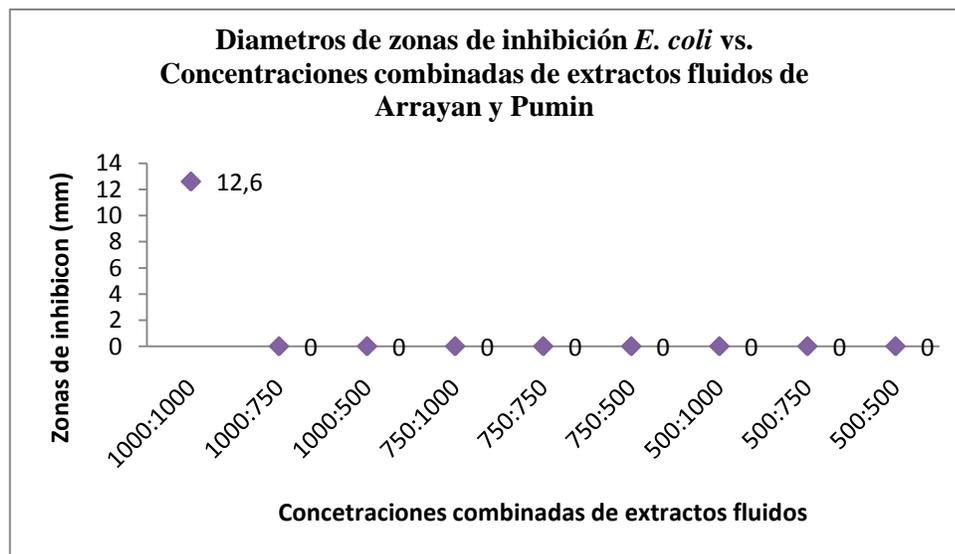
La Tabla N°30, muestra las diferentes concentraciones combinadas de los extractos en función al promedio de los halos de inhibición presentados en los ensayos, en forma descendiente, corroborando estadísticamente que la mejor combinación fue del grupo A, cuyo título fue de 1000mg/mL:1000mg/mL de los extractos fluidos arrayan y pumín respectivamente. La resistencia de *S. aureus* a la acción combinada de Extractos fluidos de Arrayán y Pumín (500:1000 y 500:750) mg/mL se manifestó por la activación de una síntesis de la pared celular, con hiperproducción de proteínas ligadoras, engrosamiento de la pared y el encarcelamiento de fármacos por hiperproducción de los componentes de

pared; el desarrollo de una vía bioquímica resistente la cual puede tener lugar por intercambio genético bloqueando el agente antimicrobiano y por eflujo donde el microorganismo es capaz de bombear hacia afuera el antimicrobiano que va entrando en la célula; estudios previos han demostrado que *S. aureus* posee genes que le permiten generar resistencia contra biocidas. TAVARES (72).

TABLA N°31. COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

<i>Escherichia coli</i>		
[] del disco (mgA : mgP)	Diámetro de zona de inhibición (promedio)	Desviación estándar
1000:1000	12,58	± 0,377
1000:750	0	-
1000:500	0	-
750:1000	0	-
750:750	0	-
750:500	0	-
500:1000	0	-
500:750	0	-
500:500	0	-

GRAFICO N°4: DIAMETROS DE ZONAS DE INHIBICION *E. coli* VS. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN



Análisis de la varianza:

Fuente	GDL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	8	1265,604	158,200	10030,716	< 0,0001
Error	72	1,136	0,016		
Total	80	1266,740			
		R²		0,999	

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco, R²: coeficiente de correlación

Fuente: Verónica Boderó

De acuerdo al análisis de varianza de la Tabla N°31, se estableció que el diámetro de las zonas de inhibición para *E. coli* mantiene una buena correlación entre sus valores, sin embargo estos diámetros variaron entre ensayos, demuestra estadísticamente que al menos una de las concentraciones es diferente de las demás.

TABLA N°32: ANÁLISIS DE DIFERENCIAS ENTRE CATEGORIAS TEST DE TUKEY PARA *Escherichia coli*

Intervalo de confianza de 95%		
Categoría	Media	Grupos
1000:1000	12,578	A
1000:500	0,000	B
1000:750	0,000	B
500:1000	0,000	B
500:500	0,000	B
500:750	0,000	B
750:1000	0,000	B
750:500	0,000	B
750:750	0,000	B

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco, R²: coeficiente de correlación

Fuente: Verónica Boderó

La Tabla N°32, confirma estadísticamente que el mejor tratamiento para inhibir el crecimiento bacteriano fue A que corresponde a una concentración de 1000mg/mL:1000mg/mL de los Extractos fluidos de Arrayan y Pumín respectivamente.

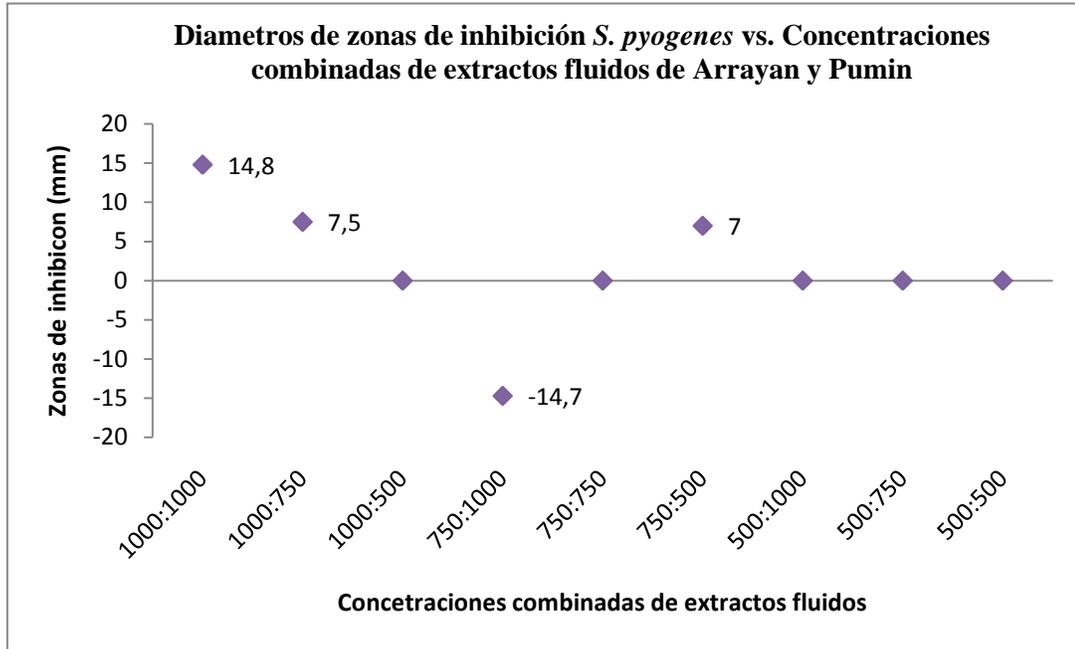
La naturaleza estructural de las bacterias Gram negativas que contienen LPS y una delgada capa de peptidoglicano sugiere su resistencia frente a los extractos fluidos combinados de Arrayán y Pumín exceptuando la combinación de 1000:1000 mg/mL de concentración de los extractos en estudio.

La resistencia de *E. coli* se expresó como producto de una alteración del sitio blanco o diana de antimicrobianos, disminución de la permeabilidad de la pared por poseer una pequeña capa de peptidoglicano, la adquisición de mecanismo de eflujo y cambio de vía metabólica externa, lo que sugiere que las diferentes combinaciones de los extractos fluidos vegetales son capaces de influir sobre los lípidos de la membrana ocasionado alteraciones en su estructura y finalmente su muerte. MEDINA (2010). (40).

TABLA N°33. COMPORTAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* i AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

<i>Streptococcus pyogenes</i>		
[] del disco (mgA : mgP)	Diámetro de zona de inhibición (promedio)	Desviación estándar
1000:1000	14,8	±0,459
1000:750	7,5	0
1000:500	0	0
750:1000	-14,7	±0,415
750:750	0	0
750:500	7	0
500:1000	0	0
500:750	0	0
500:500	0	0

GRAFICO N°5: DIÁMETROS DE ZONAS DE INHIBICIÓN *S. pyogenes* VS. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN



Análisis de la varianza:

Fuente	GDL	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F	Pr > F
Modelo	8	4629,952	578,744	13607,624	< 0,0001
Error	72	3,062	0,043		
Total	80	4633,014			
R²		0,999			

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco, R²: coeficiente de correlación

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo a la Tabla N°33, se estableció que la correlación entre las repeticiones del ensayo se encuentra dentro del rango aceptable, ya que se acerca a 1; sin embargo de la misma manera que los anteriores ensayos los diámetros de inhibición obtenidos variaron significativamente entre tratamientos.

TABLA N°34 ANÁLISIS DE DIFERENCIAS ENTRE CATEGORIAS TEST DE TUKEY PARA *Streptococcus pyogenes*

Intervalo de confianza de 95%		
Categoría	Media	Grupos
1000:1000	14,756	A
1000:750	7,500	B
750:500	7,000	C
1000:500	0,000	D
500:1000	0,000	D
500:500	0,000	D
500:750	0,000	D
750:750	0,000	D
750:1000	-14,667	E

Fuente: Verónica Bodero

De acuerdo la Tabla N°34, se determinó que el mejor tratamiento fue el A cuya concentración fue de 1000:1000mg/mL en función del diámetro de inhibición formado; se estableció que *S. pyogenes* presentó por lo menos dos mecanismos de resistencia bacteriana: el primero que se refiere a una modificación en el sitio receptor, produciendo un cambio conformacional en el ribosoma que disminuye la afinidad al antimicrobiano (macrólidos, lincosamidas y streptogramina B, fármacos químicamente distintos pero con similar mecanismo y sitio de acción); y el segundo, cuando el fenotipo M codificado en el gene *mefA* dependiente de energía, activa un sistema de expulsión para que la célula elimine a los principios activos y exprese su resistencia. RODRIGUEZ R (58)., y CAMPONOVO (9).

TABLA N°35. COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

<i>Candida albicans</i>		
[] del disco (mgA : mgP)	Diámetro de zona de inhibición (promedio)	Desviación estándar
1000:1000	0	-
1000:750	0	-
1000:500	0	-
750:1000	0	-
750:750	0	-
750:500	0	-
500:1000	0	-
500:750	0	-
500:500	0	-

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco

Fuente: Verónica Bodero

En este caso, ninguna de las combinaciones fueron eficaces frente a *C. albicans*; se presume que su resistencia se asoció con: disminución de la permeabilidad de la membrana citoplasmática, por alteración de lípidos de membrana, sobreexpresión de la enzima ERG11 y mutaciones de otras enzimas que actúa en síntesis, eliminación activa de la droga por sobreexpresión de las bombas de flujo. Sin embargo, los mecanismos demostrados son cambios en el lanosterol demetilasa, cambios en la D5-6 esterol desaturasa. SILVA (68).

TABLA N°36. COMPORTAMIENTO DE CEPAS ATCC COMO CONTROL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

CEPAS DE CONTROL			
[] del disco (mgA:mgP)	S. aureus ATCC 25923 (mm)	E. coli ATCC 25922 (mm)	C. albicans ATCC 10231 (mm)
1000:1000	11	12	0
1000:750	0	0	0
1000:500	0	0	0
750:1000	0	0	0
750:750	0	0	0
750:500	0	0	0
500:1000	0	0	0
500:750	0	0	0
500:500	0	0	0

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco, R²: coeficiente de correlación

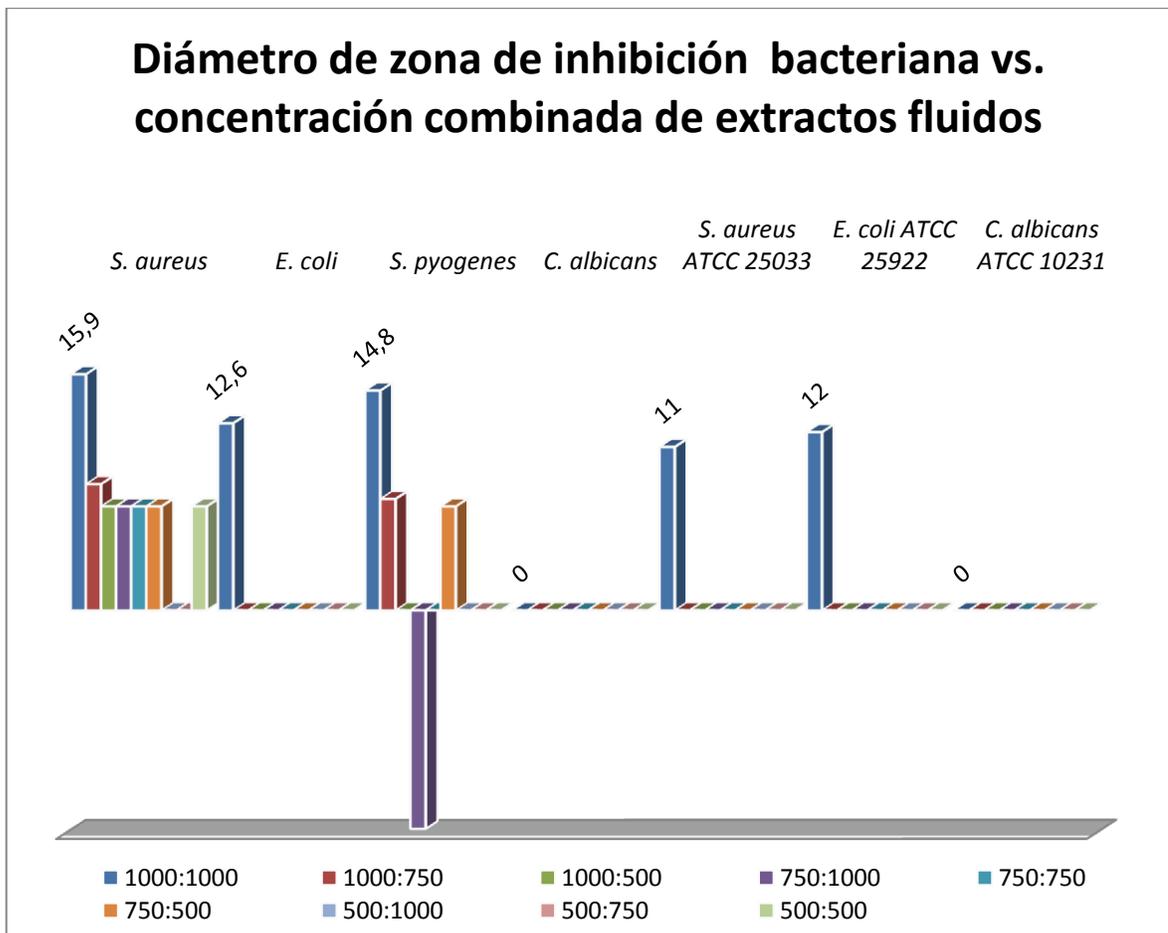
Fuente: Verónica Boderó

De acuerdo a la Tabla N°36; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 presentó una zona de inhibición inferior de la mostrada por la cepa nativa aislada, que fue entre 15,7 – 16 mm de diámetro; *Escherichia coli* ATCC 25922 mostró una zona aproximada a la presentada por su homóloga aislada, a diferencia de los diámetros de las zonas de inhibición mostrados por las concentraciones de extractos fluidos de las drogas vegetales por separado, ya que estas no presentaron zona de inhibición alguna, al igual que *Candida albicans* ATCC 10231 y su nativa mostraron la ausencia de actividad, en su falta de zona de inhibición.

b. INTERACCIONES DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA COMBINADA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN EN DISCOS FRENTE A MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES CONFIRMADAS.

Luego de un análisis exhaustivo de los resultados obtenidos, se logró identificar el mejor tratamiento relacionado con la concentración combinada de los extractos fluidos de Arrayan y Pumín; para su posterior aplicación en un dentífrico

GRAFICO N°6: DIÁMETROS DE ZONAS DE INHIBICION BACTREIANA VS. CONCENTRACIONES COMBINADAS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN



A simple vista en el Gráfico N°6; se determinó de acuerdo a los diámetros de inhibición que *S. aureus* a una concentración de 1000:1000mg/mL, mostró una zona de inhibición superior a la suma de los halos presentados por los extractos fluidos de arrayán y pumín por separado, revelando la existencia de un efecto de sinergismo, al igual que su homóloga ATCC; a diferencia de los demás tratamientos probados que presentaron indiferencia a la concentración de los discos o ausencia de efecto.

E. coli no fue inhibido por la aplicación de los discos de extractos fluidos por separado, sin embargo a una concentración de 1000:1000 mg/mL de extractos fluidos combinados mostró inhibición; se deduce este efecto por sinergismo, al igual que su respectiva ATCC.

S. pyogenes, al igual que los casos anteriores mostró sinergismo por efecto de una concentración de 1000:1000mg/mL, sin embargo una concentración de 750:1000mg/mL fue antagónico, pues se observó una zona de crecimiento alrededor del disco.

C. albicans no fue afectado en su crecimiento por ninguno de los extractos fluidos combinados aplicados. Las cepas controles ATCC, evidenciaron comportamiento similar a las cepas nativas.

La mejor concentración aplicada fue de 1000:1000mg/mL de extractos fluidos de Arrayan y Pumín combinados, porque evidencia una mayor capacidad inhibitoria sobre los microorganismos nativos aislados, en comparación con el efecto de cada uno de ellos por separado.

3.3. DENTÍFRICO INCORPORADO EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

Se preparó una pasta dental que contenía como ingredientes: a) Lauril sulfato de sodio (agente detergente, humectante, emulsificante) con gran capacidad para desnaturalizar las proteínas y por tanto con eficaz acción antiplaca, la producción de espuma ayuda a la limpieza dental. b) Carbonato de calcio (TUMS) y bicarbonato de sodio usados como agentes abrasivos, permitiendo la limpieza de los dientes por fricción sin que se dañe el esmalte, su acción blanqueadora elimina manchas y placa dental. c) Glicerina, confirió plasticidad y estabilidad, un contenido superior al 40% de este excipiente evitó la adición de conservadores, además sirvió como humectante dio consistencia y garantizó estabilidad microbiológica, d) Carboximetilcelulosa sirvió como espesante (evita que las sustancias abrasivas se sedimenten. e) Como principios activos se incorporó la mezcla más efectiva de los extractos fluidos de Arrayán y Pumín para aprovechar sus propiedades antisépticas y anestésicas, la capacidad de reducir la hipersensibilidad en encías y mejorar el aliento al reducir la proliferación de bacteriana.

3.3.1. CONTROL DE CALIDAD DEL DENTÍFRICO

TABLA N°37. CONTROL DE CALIDAD DE UN DENTIFRICO INCORPORADO EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

CARACTERÍSTICAS SENSORIALES	DENTIFRICO
ASPECTO	Homogéneo
COLOR	Verde
OLOR	Aromático
UNTUOSIDAD	Consistente

Fuente: Verónica Bodero

La Tabla N°37, mostró que las características sensoriales del producto formulado obtenidas se encuentran dentro de los límites aceptados en la Farmacopea para un producto natural; adicionalmente no existe presencia de grumos, el pH de 7,9 es el adecuado ya que la descalcificación del diente se acentúa cuando este disminuye por debajo de 5,5; la extensibilidad del dentífrico fue de 4,5 valor que está dentro de lo especificado por la REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. (55).

CONCLUSIONES

1. Los extractos fluidos de Arrayán y Pumín contienen principios activos implicados en la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* aislados de infecciones periodontales confirmadas por diagnóstico odontológico, sin embargo no controlaron a *Candida albicans* procedentes de la misma fuente.
2. Los ensayos de calidad de las drogas crudas revelaron que los materiales se encontraron en buenas condiciones para la posterior elaboración de un extracto fluido, la ausencia de contaminación, indicó que su secado fue el óptimo para evitar la pérdida de actividad terapéutica y la degradación por exceso de humedad.
3. Los ensayos de Susceptibilidad de Antimicrobianos, demostraron que la combinación de extractos fluidos de Arrayán y Pumín fueron más efectivos que los extractos fluidos usados por separado sobre los diferentes microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes* a excepción de *Candida albicans* que no presentó zona de inhibición alguna por combinación.
4. Los extractos de Arrayán y Pumín inhibieron el crecimiento de los patógenos orales, encontrando que el que posee más potencial bacteriostático fue la concentración

combinada de (1000:1000) mg/mL presentó sinergismo, y el mayor potencial bactericida sobre microorganismos Gram positivos, Gram negativos.

5. La actividad antimicrobiana de los extractos fluidos ensayados, puede explicarse por su constitución química, pues mediante TLC se reveló la presencia de esencias aromáticas como borneol, 1,8-cineol, eucaliptol, linalol, citral, triterpenos, flavonoides como quercetina, cinarina, isoquercitrina y rutina, cuya acción ha sido corroborada con estudios previos.

6. Los extractos fluidos de Arrayán y Pumín pueden incorporarse a formulaciones para la higiene bucal por su potencial antibacteriana y de control en la formación de biopelícula.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar varios estudios fitoquímicos con el fin de identificar, separar y elucidar las moléculas presentes en la fase acuosa del extracto fluido de Arrayán y Pumín responsables de la actividad antimicrobiana reportada en el presente trabajo, con el fin de generar alternativas para la obtención de nuevos antimicrobianos de amplio espectro a partir de una fuente de origen natural y con potenciales aplicaciones en higiene bucal y terapéutico odontológica.
2. Los agentes fitoterápicos incorporados a los dentífricos poseen acción antimicrobiana sobre las bacterias orales, lo cual sugiere realizar investigaciones farmacológicas sobre el uso indiscriminado, sus posibles efectos adversos, interacciones y contraindicaciones.
3. Se recomienda evaluar la actividad antimicrobiana del dentífrico formulado en este estudio, así como determinar la estabilidad del agente activo frente a factores físicos y químicos que puedan interferir en la actividad antimicrobiana..

RESUMEN

Se realizó el estudio de los componentes de Arrayán (*Myrcianthes rhopaloides*) y Pumín (*Salvia squalens*) y evaluación experimental de actividad antimicrobiana *in vitro* en cepas nativas aisladas de un Pool de saliva, para proporcionar una alternativa al tratamiento de infecciones periodontales descartando el uso obligatorio de antibióticos.

Los extractos fluidos de Arrayán y Pumín se prepararon por percolación previo control de calidad de las drogas crudas, el tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina identificó compuestos con potencial acción antimicrobiana, un screening por difusión en disco mostró actividad frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans*; se determinó las CMI y CMB de los extractos separados y su efecto combinado; se formuló un dentífrico con la mejor combinación.

El análisis físico químico de las drogas determinó contenido de humedad y cenizas dentro de los límites aceptables. El Tamizaje Fitoquímico estableció la presencia de esencias aromáticas como borneol, 1,8-cineol, eucaliptol, triterpenos, flavonoides como quercetina, cinarina y rutina.

Los extractos fluidos de Pumín y Arrayán analizados independientemente mostraron una CMI de 1000 mg/mL y CMB de 500 mg/mL, los Extractos fluidos combinados (1000:1000mg/mL) evidenciaron mejor actividad; fueron activos frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* a excepción de *Candida albicans* tendrían potenciales aplicaciones para higiene bucal y terapéutica odontológica.

SUMMARY

A study of the Arrayán components (*Myrcianthes rhopaloides*) and Pumín (*Salvia squalens*) and experimental evaluation of antimicrobial activity *in vitro* in native strains isolated of a saliva Pool was carried out to provide an alternative to the regular dental infection treatment so that the antibiotics couldn't be used anymore.

The Arrayán and Pumín fluids extracts were prepared by percolation after a raw drugs quality control, components with potential antimicrobial action were identified by phytochemical screening and thin-layer chromatography, a screening by disk diffusion showed activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* and *Candida albicans*; CMI and CMB were determinate from the separated and combined extracts; a toothpaste was formulated with the best combination.

Humidity and ashes were determined by the drugs physical-chemical analysis and these were acceptable. The phytochemical screening established the presence of aromatic essences such as: borneol, 1,8-cineol, eucalyptol, triterpenos, flavonoids as: quercetin, cinarine and rutine.

The extracts mentioned above were analyzed one by one and they showed a CMI of 1000mg/mL and CMB of 500 mg/mL, and these ones combined (1000:1000mg/mL) had better quality; they are active against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* except in *Candida albicans* and will have the best applications for oral hygiene and dental treatment.

BIBLIOGRAFÍA

1. **AGOSTA Martha.** Vademécum de Plantas Medicinales del Ecuador. Quito-Ecuador, Abyayala, 1992. 420p.
2. **ALLAN Davis.** Combinaciones de antibióticos. Medical Clinics of North America (USA).vol.71. pp.1120-1145. 1987.
3. **ANDREWS Jennifer.** Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (Inglaterra).vol.48. pp.5-16. 2001.
4. **BARRETO Liza.** Acción antimicrobiana in vitro de dentífricos conteniendo fitoterápicos. Avances en Odontoestomatología (Brasil).vol.21(4). pp195-201. 2005.
5. **BAUER A.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology (USA).vol.15. pp.493-496. 1996.
6. **BERDONCES Julio.** Principios activos y preparaciones farmacéuticas. Natural medicatrix (Colombia).vol.14. pp.37-38;50-53. 1995.

7. **BUSTOS Jaime.** *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomedica (Mexico).vol.17. pp.287-305. Noviembre.2006.
8. **CALIXTO, José.** Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Brazilian Journal of Medical and Biological Research (Brasil).vol.33(2). pp. 179-189. 2000.
9. **CAMPONOVO Rossanna.** Problemas de resistencia en *Streptococcus pyogenes*. Revista Infectología (Chile).vol.19. pp. 107-110. 2002.
10. **CANTÓN Rocio.** Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos Especiales Para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (España). 210p. 2001.
11. **CAÑIGUERAL Saul.** Identidad y pureza de drogas vegetales y extractos. Seminario Taller sobre Estandarización de Extractos Vegetales y Garantía de Calidad de Productos Fitoterápicos. Cartagena-Colombia, Picaso, 2003. Pp.4-8.
12. **CAVALIERI Stephen.** Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Ohio, Coyle, 2005. pp: 3-201.
13. **CAVLING Maikel.** Breakpoints for Susceptibility Testing Should Not Divide Wild-Type Distributions of Important Target Species. Antimicrobial

Agents And Chemotherapy (España).vol. 53(4). pp.1628-1629. Abril.2
2009

14. CERRUTTI Tamara. Plantas Medicinales .Cultivo, importancia y formas de uso.
EsSalud (Perú). pp.100-111. 2000.

15. CHAVEZ Edith. Identificación de tres factores de virulencia en cepas de
Escherichia coli aisladas de humanos. Enfermedades Infecciosas y
Microbiología (Mexico).vol.27(4). pp.114-117. 2007.

16. CHERUIYOT Olila. *In-vitro* antibacterial activity of selected medicinal plants
from Longisa region of Bomet district, Kenya. African Health Sciences
(Uganda).vol.9(1). pp.1-5. August 2009

17. CORRAL Aida. Tamizaje, tecnología, control de calidad y farmacología del
extracto fluido de *Bougainvillea spectabilis* Willd. Revista Cubana Plantas
Medicinales (Cuba).vol.2(2). pp.19-25. 1997.

18. DAN Yao. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and
soft tissue infections (SSTIs). BMC Infectious Diseases (China).vol.10.
pp.133. 2010

19. DHAR Vineet. Physiology and toxicity of fluoride. Indean Journal Of Dental
Research (Udaipur).vol.20. pp. 350-355. 2009.

- 20. DUQUE Johany.** Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar.
Revista Cubana Estomatología (Cuba).vol.45. 12p. 2006.
- 21. DURAN Ismet.** Evaluation of Antibacterial Effectiveness of Desensitizers against
Oral Bacteria. European Journal Dentistry (Inglaterra).vol.2. pp.43-47.
2008
- 22. FARIAS Francisco.** Enfermedad Periodontal y Microorganismos
Periodontopatógenos. Revista do Instituto Medicina Tropical Sao Paulo
(Brasil).vol.51(5). pp.13-22. octubre 2008
- 23. GARCIA César.** Caracterización de las Fracciones Extractables Contenidas en el
Fruto del Palo de Cera, Palo de Arrayan o Palo de Cera San Pascual (*Myrica
cerifera* L) (Proyecto de tesis) (Ing. Bioq.). San Carlos-Guatemala.
Universidad de San Carlos de Guatemala, 2002, 59p.
- 24. GIUNTA José.** Patología Bucal. México, McGraw-Hill, 1976. pp.34-35
- 25. GONÇALVES Flavia.** Antibacterial Activity of Guava, *Psidium guajava* Linnaeus,
Leaf Extracts On Diarrhea-Causing Enteric Bacteria Isolated From Seabob
Shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER) Revista do Instituto Medicina
Tropical Sao Paulo (Brasil).vol.50(1). pp.11-15. Febrero 2008

26. **GOODMAN Gracia.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. Habana-Cuba, Científico-Técnica, 1982. pp.1062-1165.
27. **HOEPRICH Paul.** Antimicrobianos y antihelminfos para el tratamiento sistémico. Habana-Cuba, Científico-Técnica, 1985. pp.154-90.
28. **HUGUET Jose.** Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. Revista Peruana Medicina Experimental (Perú).vol.19(2). pp. 1-5. 2002.
29. **KAHLMETER G.,** “Breakpoints for Susceptibility Testing Should Not Divide Wild-Type Distributions of Important Target Species” Journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy,vol.53(4); 2009, pp 1628-1629
30. **KINTNZIOS Eva.** *Salvia squalens*; Sage, The Genus *Salvia*. Francia, Taylor, 2005. 100p.
31. **LIEBANA José.** Microbiología Oral, Microbiología Periodontal. Madrid España, Mc Graw-Hall, 1995. pp.465-87.
32. **LIZCANO Andrea.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. (proyecto de

tesis) (Microb. Inds.). Bogota-Colombia. Pontificia Universidad Javeriana.
Facultad de Ciencias. pp.100-131. Junio.2008.

33. LOCK Otto. Análisis Fitoquímico y Metabolitos secundarios. EsSalud
(Venezuela). 2004. 15-27.

34. LOPEZ Patricia. Principales técnica de recogida y registro del fluido salival en el
hombre, ventajas e inconvenientes (Proyecto de tesis) (Bioq. Farm.).
Universidad de Murcia. Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y
Farmacia. 1993. pp.29-50.

35. LOPEZ Ricardo. Caracterización Físico–Química de *Passiflora incarnata* L.
Para su Uso en la Industria Farmacéutica. Revista Cubana De Química
(Cuba).vol.19(1). pp.78-80. Enero.2007.

36. LOVE Ricard. The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine.
Oral Microbiology Immunity (USA).vol.17. pp.32-37. 2002.

37. MALACHOWA Natalia. Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*.
Cellular and Molecular Life Sciences (USA).vol.67. pp.3057-3071. Abril.2010

38. MALDONADO Elena. “Análisis de la composición del aceite esencial de
Myrcianthes rhopaloides (Kunth in H.B.K.) McVaugh, *Myrtaceae*, y

evaluación de su actividad biológica. Revista La granja (Ecuador). 2008.
pp.17-24

39. MARIOTTI Angela. Colutorios y Dentífricos. Terapéutica Dental; American Dental (USA).vol.3. 2004. pp. 211-230

40. McBAIN, Andrew; Exposure of Sink Drain Microcosms to Triclosan: Population Dynamics and Antimicrobial Susceptibility. Applied and Environmental Microbiology (United States of America).vol.69(9). pp.5433–5442. Septiembre 2003

41. MEDINA Ardila. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. Avances en Periodoncia Implantológica (Colombia).vol.22(1). pp.27-35. 2010.

42. MICROBIOLOGIA: GARCÍA José. Compendio de Microbiología Médica. Madrid-España, Harcourt Brace, 1999. pp.789-790

43. MIRANDA M. Folleto de métodos de análisis de Drogas y Extractos. Habana-Cuba, Universidad de la Habana, 1996. pp.123-170.

44. MITROPHANOVA Alexander. Control of *Streptococcus pyogenes* virulence: modeling of the CovR/S signal transduction system. Journal Theoretical Biology (USA).vol.246(1). pp.113-128. Mayo.2007.

45. MURRAY Polette. Microbiología Medica. 4.ed. Madrid-España, Genora, 2000.
130p.

46. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.

Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 4.ed. documento M31-ANCCLS-Junio 1999”

47. NEIRA Alexander. Estudio fitoquímico y actividad Antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. Journal Theroretical Biology (USA).vol.190(3). pp.13-67. 2009

48. NIKAIDO Hiroshi. Multidrug Resistance in Bacteria. Annual Review Biochemistry (USA).vol.78. pp.119–146. 2009

49. OKPALUGO Joan. Toothpaste formulation efficacy in reducing oral flora. Tropical Journal of Pharmaceutical Research (Nigeria).vol.8(1). pp.71-77.
February 2009

50. OLAJIDE Awe. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical. Rio de Janeiro (Brasil).vol.70. pp. 25-31. 1999.

51. OLIS Palis. Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. (Proyecto Desarrollo de Tecnología de Cultivo de

Plantas Medicinales y Producción de Fitoterápicos). Bogota-Colombia, OEA.
2005, pp.132-150.

52. PALMIER Ricardo. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control. Brazilian Oral Research (Brasil).vol.23. pp.9-48. 2009

53. PALOMBO Eduardo. Traditional Medicinal Plant Extracts and Natural Products with Activity Against Oral Bacteria: Potential Application in the Prevention and Treatment of Oral Diseases; Evidence-Based complementary and alternative medicine (eCAM). pp.1-15. July13.2009

54. PALOMINO, Eduardo. Estudio Fitoquímico del Aceite Esencial de *Psidium caudatum* Mc Vaugh Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas (Colombia). 18p. Junio.2005.

55. PEREZ Daza. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud (Venezuela).vol.22 (3). 45p. 1998.

56. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. 2.ed Madrid-España, Ministerio de Sanidad y Consumo,2002. pp.2801.

- 57. RODRÍGUEZ Angeles.** Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica México (Mexico).vol.44(5). pp.464-475. 2002
- 58. RODRIGUEZ Romeo.** Características de la resistencia antimicrobiana de una colección clínica de *Streptococcus pyogenes*. Revista de Salud pública de México (Mexico).vol.42(3). pp.226-229. Junio.2000
- 59. ROIG Jan.** Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. Revista Cubana de Plantas Medicinales (Cuba). pp.248-250. 1967.
- 60. ROSALES Vivian.** Evaluación farmacológica de *Pluchea carolinensis* Jacq. (salvia de playa) en animales de experimentación. Revista Cubana Plantas Medicinales (Cuba).vol.4(2). pp. 65-67. 1999.
- 61. SACSAQUISPE Rocío.** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión Lima-Perú, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. 120p.
- 62. SANABRIA Gabriel.** Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. (Tesis) (Bioq. y Farm.). Bogota-Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Bioquímica y Farmacia 1983, pp.120.

- 63. SÁNCHEZ Durand.** Algunos parámetros farmacognósticos en plantas medicinales. *Revista Cubana Farmacia (Cuba)*.vol.19. pp.450-453. 1985.
- 64. SANCHEZ Eduardo.** Caracterización farmacognóstica de *Salvia officinalis* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales (Cuba)*. pp.90-98. 2005
- 65. SANTA Cruz.** Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. *Revista Cubana Farmacia (Cuba)*.vol.7. pp.450-453. 1986.
- 66. SCHAUDINN Chales.** Periodontitis, An archetypical biofilm disease. *The journal of the American Dental Association.(USA)*.vol.140. pp.978-986. 2009.
- 67. SHANGRAW Francis.** Estudio de las Prácticas Industriales Actuales en la Formulación. *Revista de Infectología (Chile)*. pp.11-23. 1994.
- 68. SILVA Víctor.** Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos *Revista de Infectología (Chile)*.vol.19(2). pp.149-156. 2002.
- 69. SOTO Sara.** Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. *Enfermedades e Infecciones Microbiológicas (España)*. vol.24(9). pp.479-480. 2006.

- 70. SUSSMANN Otto.** Resistencia bacteriana. Infecciones en cirugía.vol.4(4). Pp.35-46. 2001.
- 71. TAROCO Ramiro.** Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health (Tailandia). pp: 663-673
- 72. TAVARES Wilson.** Bacterias Gram-positivas problemas: resistencia de *Staphylococcus*, *Enterococcus* a antimicrobianos. Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical. Rio de Janeiro (Brasil).vol.5. pp.45.
- 73. THAWEBOON Sroisiri.** *In vitro* Antimicrobial Activity Of *Ocimum americanum* L. Essential Oil Against Oral Microorganisms. Southeast Asian Journal Tropical Medicine Public Health (Tailandia),vol.40(5). pp.1026-1033. 2009
- 74. TORRES Carmen.** Lectura interpretada del antibiograma de cocos Gram positivos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (España).vol.28(8). pp.541-553. 2010
- 75. VARGAS Naccarato.** De Salvia y Toronjil. Guía de Medicina Natural para la Salud de la Mujer (Perú). pp.81. 1995.
- 76. VELAZCO Geomara.** Pruebas rápidas para la detección de *Candida albicans* en cavidad bucal. Acta Odontológica (Venezuela). Pp.440-443. 2006.

- 77. VELAZCO Gladis.** Microscopic evidence of *Candida albicans* present in prosthetic bases removed of bucal cavity. Revista Cubana Estomatología (Cuba).vol.46(2). pp.1-8. 2009
- 78. WAGNER Hamil.** A thin layer Chromatography Atlas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (España).vol.18(8). pp.320. 2010
- 79. WAGNER H.** Plant Drug Analysis. Berlín-Israel, Scott, 1983. pp.163-165;299-304.
- 80. WYNGAARDEN Joel.** Tratamiento Antimicrobiano. DF.Mexico, Interamericana, 1994. Pp.1859-1872.

ANEXOS

ANEXO N° 1. CONTENIDO DE HUMEDAD POR TRIPLICADO DE HOJAS DE ARRAYÁN Y PUMÍN

TABLA N°38: POCENTAJE DE HUMEDAD CONTENIDO EN LAS HOJA DE ARRAYÁN Y PUMÍN RESPECTIVAMENTE

	m 1 (g)	m 2 (g)	m 3 (g)	%Humedad media	Desv. Estándar
ARRAYÁN	9,8	9,83	9,8	9,81	±0,0173
PUMÍN	8,12	8,12	8,11	8,12	±0,00577

m1: repetición N°1; m2: repetición N°2; m3: repetición N°3 para contenido de humedad

Fuente: Verónica Bodero

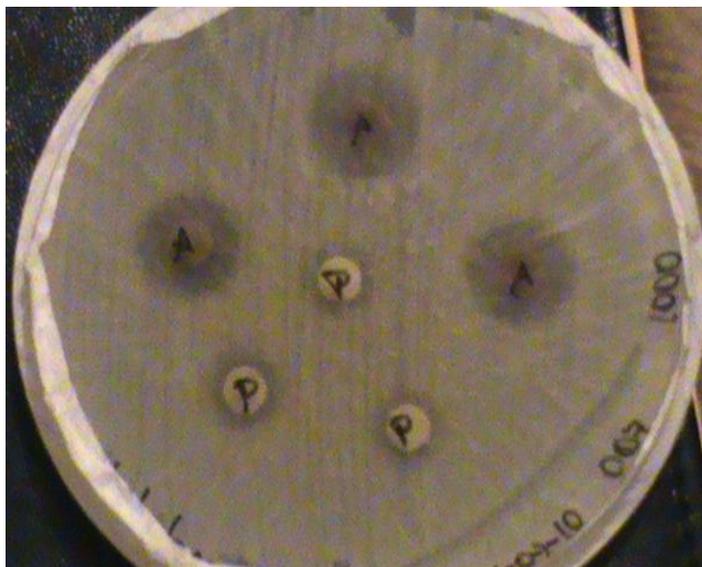
ANEXO N° 2. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN POR SEPARADO POR METODO DE DIFUSION EN DISCO DE CONCENTRACIÓN DE 1000mg/mL, 100mg/mL Y DE 10mg/mL FRENTE A MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES CONFIRMADAS.

TABLA N°39: COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

		<i>Staphylococcus aureus</i>								
Arrayán	1000	8	8	7,5	8	7,6	7,7	8	7,8	8
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pumín	1000	7	7,1	7,1	7	7,3	7	7	7,1	7
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Número de repetición;

Fuente: Verónica Bodero



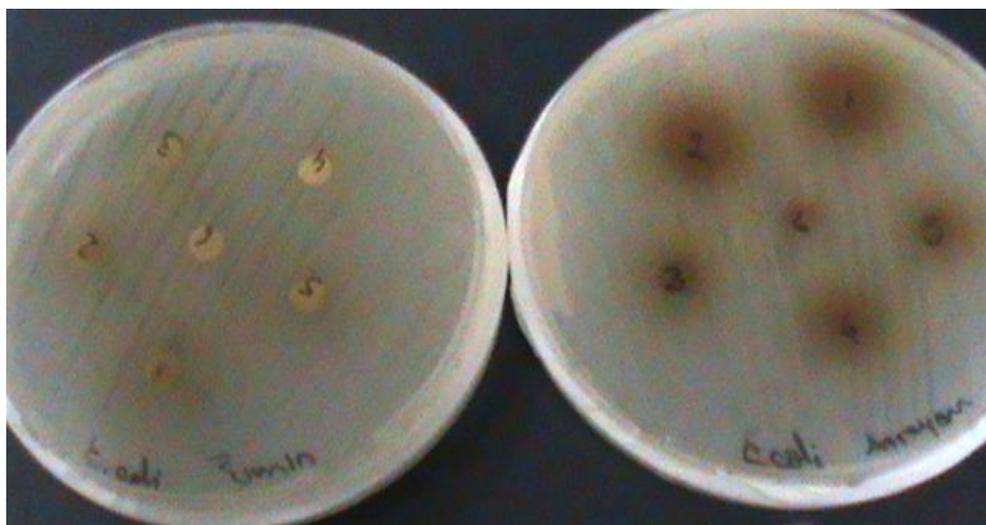
FOTOGRAFIA N°15. Ensayo biológico en *Staphylococcus aureus* frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10 mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente

TABLA N°40: COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

		<i>Escherichia coli</i>									
Arrayan	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pumín	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Número de repetición;

Fuente: Verónica Bodero



FOTOGRAFIA N°16. Ensayo biológico en *Escherichia coli* frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10 mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente

TABLA N°41: COMPORTAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

		<i>Streptococcus pyogenes</i>								
Arrayán	1000	7	7	7,1	7	7	7	7,1	7,1	7,1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pumín	1000	7,5	7,3	7,5	7,5	7,4	7,3	7,4	7,2	7,2
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Número de repetición;

Fuente: Verónica Bodero



FOTOGRAFIA N°17. Ensayo biológico en *Streptococcus pyogenes* frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente

TABLA N°42: COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

		<i>Candida albicans</i>								
Arrayan	1000	8	8	7,8	8	7,9	8,1	8	8	7,8
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pumín	1000	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Número de repetición;

Fuente: Verónica Bodero



FOTOGRAFIA N°18. Ensayo biológico en *Candida albicans* frente a Sensidisco de 1000mg/mL, 100mg/mL, 10mg/mL de Arrayan y Pumín respectivamente

TABLA N°43: COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMIN

		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC								
Arrayán	1000	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pumín	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Número de repetición;

Fuente: Verónica Bodero

TABLA N°44: COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

		<i>Escherichia coli</i> ATCC									
Arrayán	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pumín	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Número de repetición;

Fuente: Verónica Bodero

TABLA N°45: COMPORTAMIENTO DE *Candida albicans* ATCC AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

		<i>Candida albicans</i> ATCC									
Arrayán	1000	10	9,7	9,7	10	9,8	9,9	9,6	9,7	9,7	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Pumín	1000	7	7,1	7,2	7	7,1	7	7,1	7	7	
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

R: Número de repetición;

Fuente: Verónica Bodero



FOTOGRAFIA N°19. Ensayo biológico en *Staphylococcus aureus* ATCC frente a Sensidisco de 1000, 100, 10mg/mL de extractos por separado



FOTOGRAFIA N°20. Ensayo biológico en *Escherichia coli* ATCC frente a Sensidisco de 1000, 100, 10mg/mL de extractos por separado



FOTOGRAFIA N°21. Ensayo biológico en *Candida albicans* ATCC frente a Sensidisco de 1000, 100, 10mg/mL de extractos por separado

ANEXO N°3. MACRODILUCION EN CALDO CON EXTRACTO FLUIDO DE ARRAYAN Y PUMÍN PARA CMI Y CMB



FOTOGRAFIA 22. Juego de Frascos de Pumín para prueba de Macrodilución en caldo para CIM después de 24 horas.



FOTOGRAFIA 23. Juego de Frascos de Arrayan para prueba de Macrodilución en caldo para CIM después de 24 horas.

CMB

Tabla N° 46: RECUENTO DE UFC/INÓCULO

ARRAYÄN		PUMÏN	
N° Dilución	Ufc/inóculo	N° Dilución	Ufc/inóculo
A ₀	0	P ₀	0
A ₁	0	P ₁	0
A ₂	15	P ₂	0
A ₃	Campo lleno	P ₃	Campo lleno
A ₄	Campo lleno	P ₄	Campo lleno
A ₅	Campo lleno	P ₅	Campo lleno

A₀: control de esterilidad; A₁: 1000mg/mL; A₂:500mg/mL; A₃:250 mg/mL; A₄:125 mg/mL; A₅:62,5 mg/mL de extracto fluido de Arrayan; P₀: control de esterilidad; P₁: 1000mg/mL; P₂: 500mg/mL P₃: 250 mg/mL; P₄: 125 mg/mL; P₅:62,5mg/mL de extracto fluido de Pumin

ANEXO N°4. TABLA DE RECHAZOS PARA CMB Y CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE CONCENTRACIÓN INICIAL

TABLA N°47. VALORES DE RECHAZO Y CÁLCULO DE SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE CONCENTRACIÓN INICIAL

Inóculo Inicial (UFC/mL)	Valor de Rechazo	Sensibilidad	Especificidad
1x10 ⁵	4	77	97
2x10 ⁵	8	89	99
3x10 ⁵	15	99	99
4x10 ⁵	20	99	99
5x10 ⁵	25	99	99
6x10 ⁵	29	99	99
7x10 ⁵	33	99	99
8x10 ⁵	38	99	99
9x10 ⁵	42	99	99
1x10 ⁶	47	99	99
2x10 ⁶	91	99	99
3x10 ⁶	136	99	99
4x10 ⁶	182	99	99
5x10 ⁶	227	99	99
6x10 ⁶	273	99	99
7x10 ⁶	318	99	99
8x10 ⁶	364	99	99
9x10 ⁶	409	99	99
1x10 ⁷	455	99	99

Ejemplo de interpretación de tabla: si el inóculo fue de 6,2x10⁵ UFC/mL entonces será >29 UFC se define como rechazo para este caso.

ANEXO N° 5. SENSIBILIDAD MICROBIANA DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN COMBINADOS POR METODO DE DIFUSION EN DISCO DE CONCENTRACIÓN DE 1000mg/mL, 100mg/mL Y DE 10mg/mL FRENTE A MICROORGANISMOS IMPLICADOS EN INFECCIONES PERIODONTALES CONFIRMADAS.

TABLA N°48. COMPORTAMIENTO DE *Staphylococcus aureus* AISLADO DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

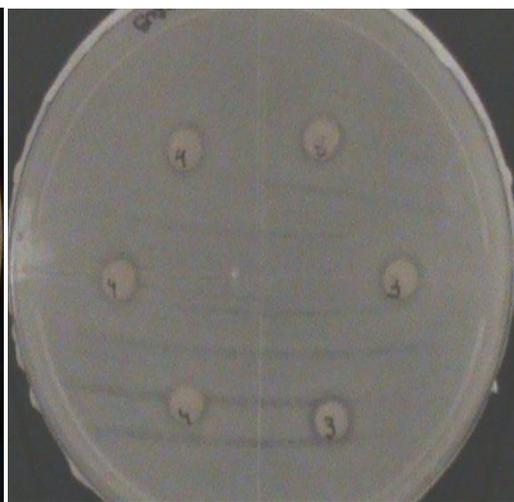
MICROORGANISMO A EVALUAR									
<i>Staphylococcus aureus</i>									
[] del disco (mgA : mgP)	R1 (mm)	R2 (mm)	R3 (mm)	R4 (mm)	R5 (mm)	R6 (mm)	R7 (mm)	R8 (mm)	R9 (mm)
1000:1000	16	15,8	16	15,7	15,9	15,8	16	15,9	16
1000:750	9	9	8	8,7	8,9	8	8,4	8,3	8,5
1000:500	7	7	7	7	7	7	7	7	7
750:1000	7	7	7	7	7	7	7	7	7
750:750	7	7	7	7	7	7	7	7	7
750:500	7	7	7	7	7	7	7	7	7
500:1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500:750	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500:500	7	7	7	7	7	7	7	7	7

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco, R²: coeficiente de correlación

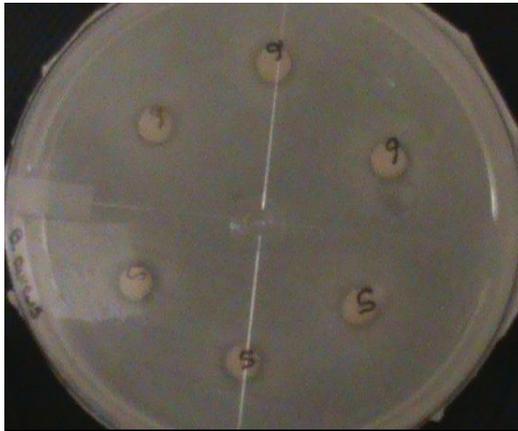
Fuente: Verónica Bodero



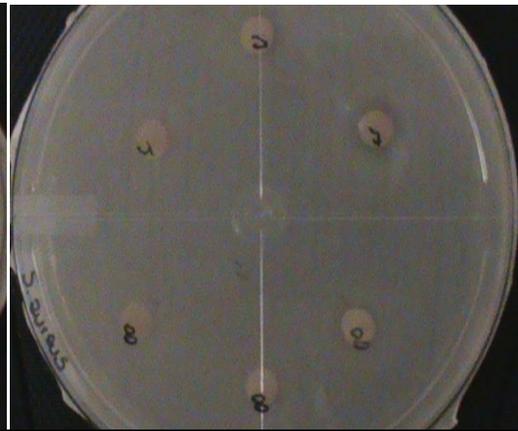
FOTOGRAFIA N°24. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:1000 y 1000:750 combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus*



FOTOGRAFIA N°25. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:500 y 750:1000 combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus*



FOTOGRAFIA N°26. Ensayo biológico de sensidiscos 750:750 y 750:500 combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus*



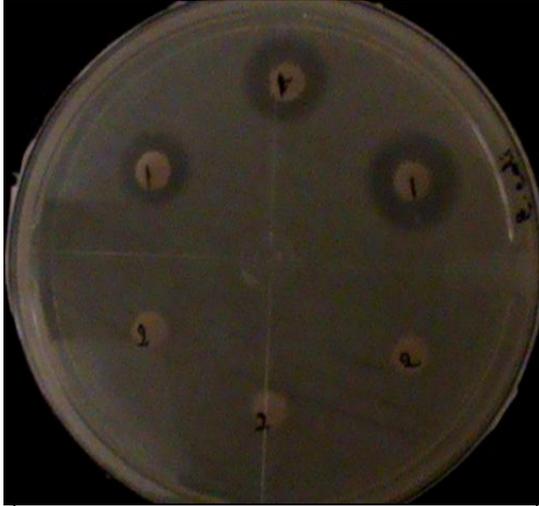
FOTOGRAFIA N°27. Ensayo biológico de sensidiscos 500:1000 y 500:750 combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus*

TABLA N°49. COMPORTAMIENTO DE *Escherichia coli* AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

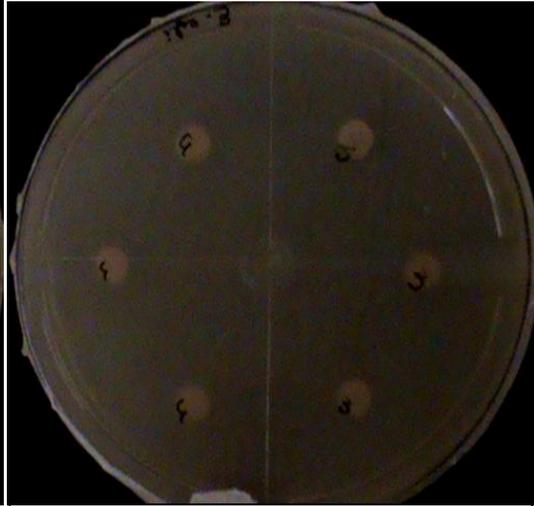
MICROORGANISMO A EVALUAR									
<i>Escherichia coli</i>									
[] del disco (mgA : mgP)	R1 (mm)	R2 (mm)	R3 (mm)	R4 (mm)	R5 (mm)	R6 (mm)	R7 (mm)	R8 (mm)	R9 (mm)
1000:1000	12	12	13	12,5	12,6	12,5	12,8	12,8	13
1000:750	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750:1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750:750	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500:1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500:750	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0

R: Número de repetición; [] de disco (mgA:mgP): concentración de extracto fluido de Arrayan y Pumín presentes en el disco, R²: coeficiente de correlación

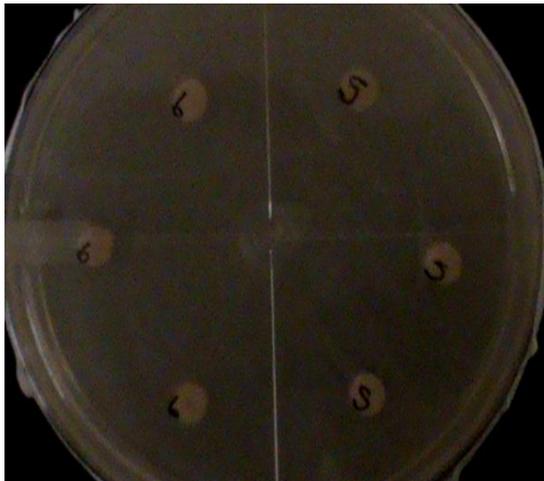
Fuente: Verónica Bodero



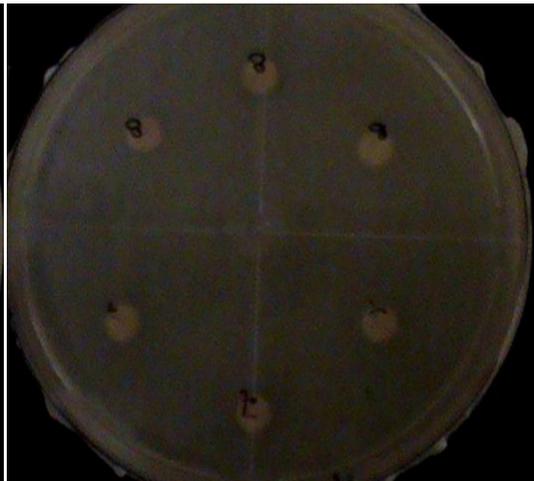
FOTOGRAFIA N°28. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:1000 y 1000:750 combinados de extractos frente a *Escherichia coli*



FOTOGRAFIA N°29. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:500 y 750:1000 combinados de extractos frente a *Escherichia coli*



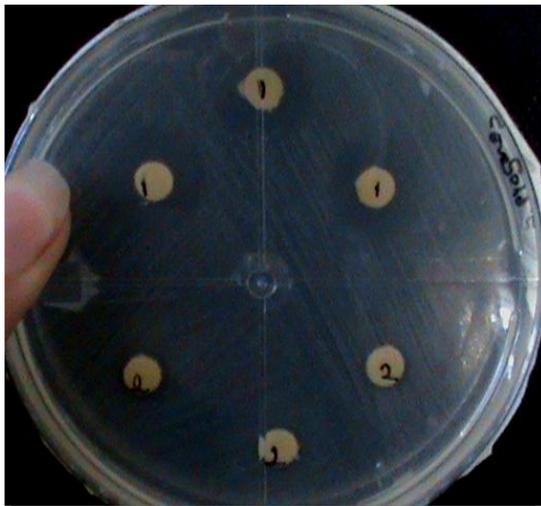
FOTOGRAFIA N°30. Ensayo biológico de sensidiscos 750:750 y 750:500 combinados de extractos frente a *Escherichia coli*



FOTOGRAFIA N°31. Ensayo biológico de sensidiscos 500:1000 y 500:750 combinados de extractos frente a *Escherichia coli*

TABLA N°50. COMPORTAMIENTO DE *Streptococcus pyogenes* i AISLADA DE UN POOL SALIVAL FRENTE A AGENTES ANTIMICROBIANOS PRESENTES EN DISCOS IMPREGNADOS DE UNA COMBINACION DE EXTRACTOS FLUIDOS DE ARRAYAN Y PUMÍN

MICROORGANISMO A EVALUAR									
<i>Streptococcus pyogenes</i>									
[] del disco (mgA : mgP)	R1 (mm)	R2 (mm)	R3 (mm)	R4 (mm)	R5 (mm)	R6 (mm)	R7 (mm)	R8 (mm)	R9 (mm)
1000:1000	15	14	14	15,2	15	15,1	14,9	14,6	15
1000:750	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
1000:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750:1000	-14	-15	-14	-14,5	-15	-14,7	-14,8	-15	-15
750:750	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750:500	7	7	7	7	7	7	7	7	7
500:1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500:750	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500:500	0	0	0	0	0	0	0	0	0



FOTOGRAFIA N°32. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:1000 y 1000:750 combinados de extractos frente a *Streptococcus pyogenes*



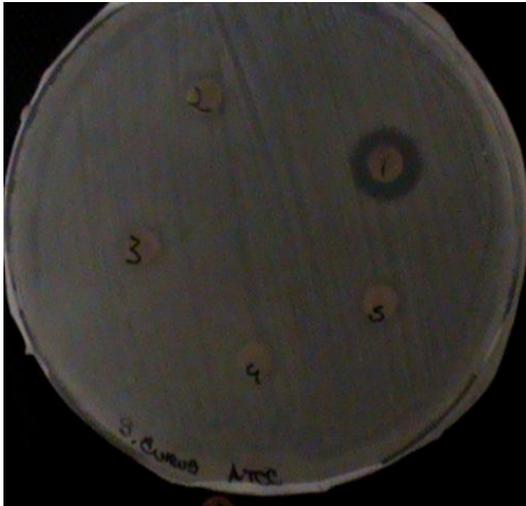
FOTOGRAFIA N°33. Ensayo biológico de sensidiscos 1000:500 y 750:1000 combinados de extractos frente a *Streptococcus pyogenes*



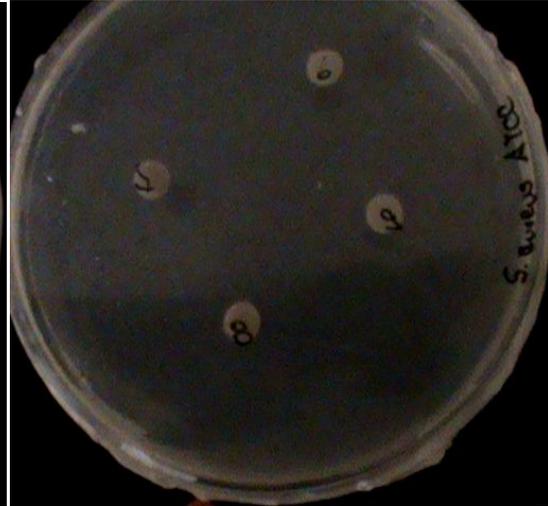
FOTOGRAFIA N°36. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Candida albicans* ATCC

CEPAS DE CONTROL

Staphylococcus aureus ATCC 25923

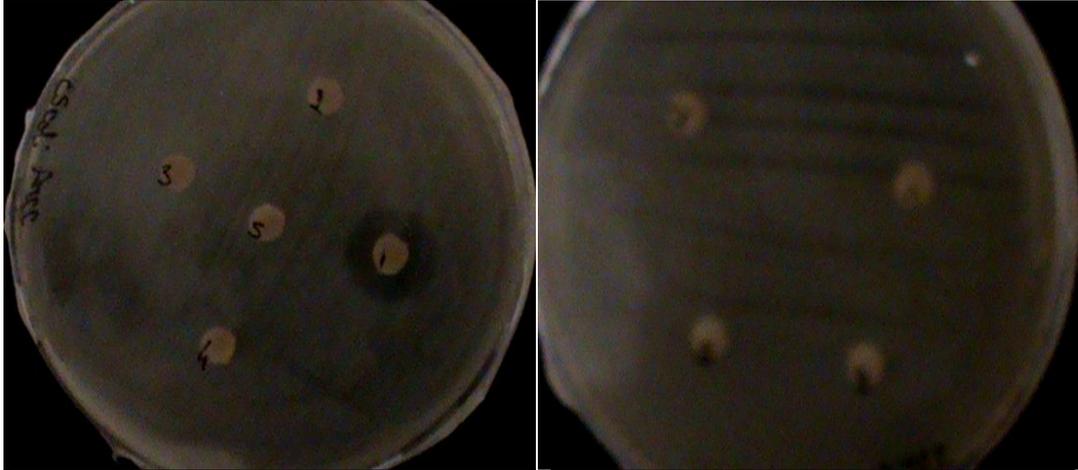


FOTOGRAFIA N°37. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC



FOTOGRAFIA N°38. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC

Escherichia coli ATCC 25922



FOTOGRAFIA N°39. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Escherichia coli* ATCC

FOTOGRAFIA N°40. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Escherichia coli* ATCC

Candida albicans ATCC



FOTOGRAFIA N°41. Ensayo biológico de sensidiscos a diferentes concentraciones combinados de extractos frente a *Candida albicans* ATCC

ANEXO N°6. LISTA DE PERFILES NUMÉRICOS api ® Candida

TABLA N° 52. LISTA DE PÉRFILES NUMÉRICOS api ® Candida.

Código	Especie	Código	Especie
0403	<i>Trichosporon spp2</i>	7043	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>
0412	<i>Trichosporon spp2</i>	7051	<i>C. neoformans 2/C. neoformans 1</i>
0413	<i>Trichosporon spp2</i>	7053	<i>C. neoformans 2/Trichosporon spp 1</i>
0417	<i>Trichosporon spp2</i>	7100	<i>Candida famata</i>
1000	<i>Candida krusei</i>	7102	<i>Candida albicans</i>
1010	<i>Candida krusei</i>	7104	<i>Candida famata</i>
1100	<i>Candida glabrata</i>	7110	<i>Candida tropicalis/Candda albicans</i>
1300	<i>Candida glabrata</i>	7112	<i>Candidas albicans</i>
1402	<i>Trichosporon spp 2</i>	7120	<i>Candida lusitaniae/C. famata /C. guilliermondi</i>
1412	<i>Trichosporon spp 2</i>	7200	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1413	<i>Trichosporon spp 2</i>	7204	<i>Candida kefyri</i>
1416	<i>Trichosporon spp 2</i>	7213	<i>Trichosporon spp 1 / C. neoformans 1</i>
1417	<i>Trichosporon spp 2</i>	7220	<i>Candida guilliermondii</i>
1443	<i>Trichosporon spp 2</i>	7224	<i>Candida kefyri</i>
1453	<i>Trichosporon spp 2</i>	7241	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>
2403	<i>Trichosporon spp 2</i>	7243	<i>C. neoformans 1 / C. neoformans 2</i>
2412	<i>Trichosporon spp 2</i>	7251	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>
2413	<i>Trichosporon spp 2</i>	7253	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 1</i>
2417	<i>Trichosporon spp 2</i>	7300	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3000	<i>Geotrichum spp</i>	7310	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
3001	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>	7312	<i>Candida albicans</i>
3003	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 2</i>	7320	<i>Candida guilliermondii</i>
3020	<i>Geotrichum spp</i>	7324	<i>Candida kefyri</i>
3041	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>	7341	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>
3043	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>	7351	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>
3051	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>	7413	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 2</i>
3053	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>	7417	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 2</i>
3100	<i>Candida famata</i>	7420	<i>Candida lusitaniae / Candida guilliermondii</i>
3241	<i>C. neoformans 1/C. neoformans 2</i>	7441	<i>C. neoformans 1 / C. neoformans 2</i>
3251	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7453	<i>Trichosporon spp 1</i>
3402	<i>Trichosporon spp 2</i>	7457	<i>Trichosporon spp 1</i>
3403	<i>Trichosporon spp 2</i>	7500	<i>Candida lusitaniae</i>
3407	<i>Trichosporon spp 2</i>	7510	<i>Candida tropicalis</i>
3412	<i>Trichosporon spp 2</i>	7512	<i>Candida albicans</i>
3413	<i>Trichosporon spp 2</i>	7513	<i>Trichosporon spp 1</i>
3416	<i>Trichosporon spp 2</i>	7520	<i>Candida lusitaniae</i>
3417	<i>Trichosporon spp 2</i>	7530	<i>Candida tropicalis</i>
3443	<i>Trichosporon spp2 / C.neoformans 2</i>	7553	<i>Trichosporon spp 1</i>
3453	<i>Trichosporon spp 2</i>	7557	<i>Trichosporon spp 1</i>

3641	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7600	<i>Candida guilliermondii</i>
3651	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7603	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 1</i>
3653	<i>Trichosporon spp1 /C. neoformans 1</i>	7611	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 1</i>
5000	<i>Candida famata / C. parapsilosis</i>	7613	<i>Trichosporon spp 1</i>
5100	<i>Candida famata</i>	7617	<i>Trichosporon spp 1</i>
5104	<i>Candida famata</i>	7620	<i>Candida guilliermondii</i>
5200	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7641	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>
5241	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7643	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 1</i>
5243	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7647	<i>Trichosporon spp 1</i>
5251	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7651	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 1</i>
5253	<i>C. neoformans 1/Trichosporon spp 1</i>	7652	<i>Trichosporon spp 1</i>
5300	<i>Saccharomyces cerevisiae/ Candida famata</i>	7653	<i>Trichosporon spp 1 / C. neoformans 1</i>
5641	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7657	<i>Trichosporon spp 1</i>
5651	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>	7671	<i>C. neoformans / Trichosporon spp 1</i>
5653	<i>Trichosporon spp 1 C. neoformans</i>	7700	<i>Candida guilliermondii</i>
7000	<i>Candida parapsilosis</i>	7717	<i>Trichosporon spp 1</i>
7001	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>	7720	<i>Candida guilliermondii</i>
7002	<i>Candida albicans</i>	7741	<i>Cryptococcus neoformans 1</i>
7003	<i>Cryptococcus neoformans 2</i>	7751	<i>C. neoformans 1 / Trichosporon spp 1</i>
7012	<i>Candida albicans</i>	7753	<i>Trichosporon spp 1</i>
7041	<i>C. neoformans 1/C neoformans 2</i>	7757	<i>Trichosporon spp 1</i>