

**UNIVERSIDAD NACIONAL “HERMILIO VALDIZÁN”**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA**



---

**“EFECTO ANTIBACTERIANO ENTRE EL ACEITE ESENCIAL  
DE CALÉNDULA OFFICINALIS 15% Y LA CLORHEXIDINA 0,12%  
FRENTE A CEPAS DE PHORPHYROMONAS GINGIVALIS  
(ESTUDIO IN VITRO), Lima - 2019**

---

**TESIS PARA OBTAR EL TITULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**TESISTAS**

**Bach. DELGADO TRUJILLO, Mayra Alejandra**

**Bach. RAMOS ATO, Deissy Sthefany**

**ASESOR**

**Mg. C.D. BALLARTE BAYLÓN, Antonio Alberto**

**HUÁNUCO-PERÚ**

**2020**

## **DEDICATORIA**

A Dios y a la Virgen por guiarme en cada paso que doy. Para las personas más importantes; mis padres, por su confianza y apoyo en el trayecto de mi vidas, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos, cuidándome y dándome fortaleza para continuar con mis objetivos, a mis abuelos, quienes a lo largo de mi vida han velado por el bienestar siendo un apoyo en todo momento. Es gracias a ellos que hoy puedo cumplir con mis metas trazadas.

**DELGADO TRUJILLO, Mayra Alejandra**

A Dios por darme la vida y guiar cada paso que doy, a mis padres por su apoyo incondicional, por velar por mi bienestar y educación, a mis hermanos que me enseñaron a creer y confiar en lo que hago, a mis ángeles por cuidarme y darme la fortaleza para continuar y a toda mi familia que en algún momento me dieron la mano o una palabra de aliento cuando lo necesite.

**RAMOS ATO, Deissy Sthefany**

## AGRADECIMIENTO

Como autoras de la presente investigación estamos muy agradecidas con nuestro Tutor, Mg. C.D. Antonio Alberto Ballarte Baylon por su amistad infinita, sus conocimientos y experiencia en la orientación y elaboración de este proyecto.

Al Mg. Biólogo Domingo Iparraguirre León jefe del Laboratorio de Anatomía Farmacognosia Vegetal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la ciudad de Lima por su valioso tiempo y orientación en el reconocimiento e información de la planta y la preparación del aceite esencial de *Caléndula Officinalis* al 15%.

Al personal de Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur-Lima y Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar Central “Crl Luis Arias Schreiber” -Lima a cargo del microbiólogo Elfer Valdivia Paz Soldán por su constante apoyo y su gran calidez como persona en la realización del presente proyecto.

Al Cirujano Dentista Ivan Rick Velásquez Rodríguez por su valiosa colaboración y orientación en la parte estadística de nuestro proyecto.

Así mismo, expresamos nuestra gratitud y consideración al Cirujano Dentista Juan Augusto, Fernández Tarazona quien ha sido un pieza importante en la elaboración de esta investigación.

A nuestros padres y profesores de la Escuela de Odontología de la Universidad Nacional “Hermilio Valdizàn” que nos brindaron su apoyo e hicieron posible la realización de esta tesis. GRACIAS.

## INDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
INDICE.....	iv
RESUMEN.....	vi
SUMMARY .....	vii
INTRODUCCIÓN.....	viii
CAPÍTULO I.....	9
1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	9
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	9
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	10
1.2.1 Problema principal:.....	10
1.2.2 Problemas secundarios:.....	10
1.3 OBJETIVOS .....	11
1.3.1 Objetivo general .....	11
1.3.2 Objetivos específicos .....	11
1.4 JUSTIFICACIÓN .....	12
1.5 VIABILIDAD.....	13
CAPÍTULO II.....	14
2 MARCO TEÓRICO .....	14
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES .....	14
2.1.2 Antecedentes locales .....	20
2.2 BASES TEÓRICAS Y CIENTÍFICAS.....	22
2.3 DEFINICIÓN DE CONCEPTOS BÁSICOS.....	35
2.4 HIPÓTESIS.....	36
2.4.1 Hipótesis de la investigación.....	36
2.4.2 Hipòtesis nula.....	36
2.5 VARIABLES .....	37
2.5.1 Variable independiente.....	37
2.5.2 Variable dependiente:.....	37
2.6 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES. <sup>51</sup> .....	38
CAPÍTULO III.....	39
3 METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	39
3.1 NIVEL, TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	39
3.1.1 Nivel:.....	39

3.1.2	Tipo: .....	39
3.2	DISEÑO Y ESQUEMA DE LA POBLACIÓN.....	40
3.3	DETERMINACIÓN DE POBLACIÓN Y MUESTRA .....	40
3.3.1	Población.....	40
3.3.2	Muestra.....	40
3.4	TIPO DE MUESTREO: .....	41
3.5	UNIDADES DE ANALISIS .....	41
3.6	CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	41
3.6.1	Criterios de Inclusión .....	41
3.6.2	Criterios de Exclusión .....	41
3.7	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS. ....	42
3.7.1	Tecnica:.....	42
3.7.2	Instrumento: .....	47
3.8	TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	49
3.8.1	Análisis de los resultados .....	49
CAPITULO IV.....		50
4	PRESENTACION DE RESUTADOS .....	50
4.1	ANÁLISIS UNIVARIADO .....	50
CAPITULO V .....		80
5	DISCUSIÓN.....	80
CONCLUSIONES .....		82
SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES.....		83
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....		84
ANEXOS.....		90

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la diferencia del efecto antibacteriano del aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* al 15% comparado con la Clorhexidina al 0.12% frente a cepas de *P. Gingivalis* (estudio in vitro). Es un estudio de tipo experimental, prospectivo, longitudinal, analítico. Para la obtención del aceite esencial se procesó las flores secas de *C. Officinalis* mediante el procedimiento de sistema de arrastre de vapor- hidrodestilación; para su dilución al 15% se empleó Dimetilsufóxido (DMSO). Utilizando un asa de siembra estéril se tomó colonias de *P. Gingivalis* y se diluyó en 6ml de caldo nutritivo (tioglicolato). La *P. Gingivalis* fue sembrada por diseminación y colocada en 24 placas Petri conteniendo agar Schaedler; con un socavado se procede a la elaboración de 3 pocillos de 40uL de capacidad en cada placa Petri.; utilizando una micropipeta calibrada, se aplicaron en cada pocillo las soluciones correspondientes de Aceite esencial de *C. Officinalis* 15%, Clorhexidina 0,12% (control positivo) y Suero Fisiológico 0.9% (control negativo) fueron selladas y colocadas en las jarras de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis y se cerraron herméticamente para llevarlas a la incubadora a 37° C por 24h, 48h y 72h tiempo en las cuales se realizaron las observaciones y mediciones respectivas de los halos de inhibición con una regla milimetrada a contraluz y fueron anotados en una ficha de recolección de datos. Los cuales se sometieron a análisis estadísticos de ANOVA (1F).

**Los resultados** demostraron que, el promedio del diámetro de los halos de inhibición sobre la *P. Gingivalis* a las 24 horas del aceite esencial de *C. Officinalis* al 15% fue de 58,3% (14) presenta categoría de 9 a 14 mm, 41.7% (10) presenta categoría de 15 a 19 mm., a las 48 horas fue de 54.2% (13) presenta categoría 15 a 19 mm, 29.2% (7) presenta categoría de  $\geq 20$  mm, 16.7% (4) presenta una categoría de 9 a 14 mm y a las 72 horas fue de 70.8% (17) presenta categoría de  $\geq$  a 20 mm, 16.7% (4) presenta categoría de  $<$  a 8 mm y 12.5% (3) presenta categoría de 15 a 19 mm.

**En conclusión** el aceite esencial de *C. Officinalis* al 15% presentó efectividad antibacteriana sobre cepas de *P. Gingivalis*, incluso mayor efectividad que la Clorhexidina al 0,12%.

**Palabras clave:** *Caléndula Officinalis*, halos de inhibición, *Porphyromonas Gingivalis*.

## SUMMARY

The objective of this research was to determine the difference in the antibacterial effect of the essential oil of *Calendula Officinalis* at 15% compared to Chlorhexidine at 0.12% against *P. Gingivalis* strains (in vitro study). It is an experimental, prospective, longitudinal, analytical study. In order to obtain the essential oil, the dried flowers of *C. Officinalis* were processed by means of the steam-hydrodistillation system; Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used for its 15% dilution.

Using a sterile planting handle, colonies of *P. Gingivalis* were taken and diluted in 6ml of nutrient broth (thioglycolate). *P. Gingivalis* was seeded by dissemination and placed in 24 Petri dishes containing Schaedler agar; with an undercut, 3 wells of 40uL capacity are prepared in each Petri dish .; using a calibrated micropipette, the corresponding solutions of Essential Oil of *C. Officinalis* 15%, Chlorhexidine 0.12% (positive control) and Physiological Serum 0.9% (negative control) were sealed in each well and placed in the anaerobic jugs with an anaerobiosis generator envelope and they were closed tightly to take them to the incubator at 37° C for 24h, 48h and 72h time in which the respective observations and measurements of the inhibition halos were made with a ruled backlit ruler and were recorded in a data collection sheet. Which were subjected to statistical analysis of ANOVA (1F).

**The results** showed that, the average diameter of the inhibition halos on *P. Gingivalis* at 24 hours of the essential oil of *C. Officinalis* at 15% was 58.3% (14) has a 9 to 14 mm category, 41.7% (10) have a 15 to 19 mm category, at 48 hours it was 54.2% (13) it has a 15 to 19 mm category, 29.2% (7) have a category of  $\geq 20$  mm, 16.7% (4) it presents a category of 9 to 14 mm and at 72 hours it was 70.8% (17) it presents a category of  $\geq 20$  mm, 16.7% (4) it presents a category of  $< 8$  mm and 12.5% (3) it presents a category of 15 to 19 mm.

**In conclusion**, the essential oil of *C. Officinalis* at 15% showed greater antibacterial effectiveness on strains of *P. Gingivalis*, even more effective than Chlorhexidine at 0.12%

**Keywords:** *Calendula Officinalis*, inhibition halos, *Porphyromonas Gingivalis*.

## INTRODUCCIÓN

Para tratar diferentes enfermedades de forma natural en los seres vivos y preservar su salud, han sido utilizadas desde la antigüedad diversas plantas con fines alimenticios y medicinales, pero muchas de ellas son utilizadas únicamente mediante conocimiento empírico. El Perú, específicamente, es uno de los países con mayor diversidad.

La población actual necesita y busca nuevas alternativas de tratamiento, de costo mínimo y beneficios altos para tratar distintas patologías entre ellas las bucales. Actualmente, la enfermedad periodontal se presenta en un gran porcentaje en las personas mayores de 35 años. Es de suma importancia indicar esto ya que durante esta edad aumentan los riesgos de sufrir un evento cardiovascular, diabetes o de sufrir un parto prematuro. Todas estas guardan relación directa con las enfermedades periodontales. El tratamiento periodontal va dirigido tanto a restablecer como a mantener la salud y función del periodonto.

Por lo citado anteriormente, este proyecto tiene como objetivo evaluar el efecto antibacteriano entre el aceite esencial obtenido de plantas medicinales como es la *Caléndula Officinalis* y la clorhexidina 0.12% frente a cepas de *Porphyromona Gingivalis*, teniendo en cuenta que nuestra población necesita alternativas de bajo costo para el tratamiento de infecciones bucales, con lo cual se proporcionaría información al profesional odontólogo en la eficacia del uso de fitoterapia frente a uno de los agentes causales de la enfermedad periodontal.



# CAPÍTULO I

## 1 PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Se realiza este estudio debido a que no existían estudios científicos acerca del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Caléndula Officinalis* en la concentración de 15% y Clorhexidina 0.12% frente a cepas de *Porphyromona Gingivalis*, una bacteria oportunista presente en enfermedades periodontales por lo cual el propósito de este proyecto es constituir el primer paso en la investigación sobre el efecto antibacteriano de dicha planta. Así, en un futuro, podremos obtener tratamientos alternativos de bajo costo, fácil adquisición y coadyuvante en tratamientos actuales para el paciente y ser empleado como alternativa de tratamiento a otras enfermedades relacionadas a la mencionada bacteria tema aún no investigado a profundidad, cuyos resultados nos ayudarán a elegir un mejor tratamiento en las labores odontológicas.

En la cavidad oral, existen aproximadamente unas 600 especies bacterianas, de las cuales solo se identifican de unas 50 a 150. Existen además zonas que son susceptibles a ser colonizadas superficialmente por las bacterias, las cuales constituyen nichos, como lo son: la mucosa oral, el dorso de la lengua, surco gingival, superficies dentales, restauraciones fijas o removibles y la propia saliva en sí.<sup>1</sup>

Las enfermedades periodontales son de etiología multifactorial afectan las estructuras del soporte dentario ocasionando la pérdida de la pieza dentaria. Es la segunda enfermedad más prevalente de la boca después de la caries dental. Afecta, en nuestro medio, a un 85% de la población según el Ministerio de Salud.<sup>1</sup>

La *Porphyromona Gingivalis*, bacilo Gram negativo que forma colonias uniformes, es un patógeno oportunista bien adaptado a la mucosa oral, mejor conocido por su participación en la periodontitis, halitosis, periimplantitis. También puede ser un mediador importante en el desarrollo de enfermedades

crónicas como aterosclerosis, diabetes, cánceres orodigestivos, artritis reumatoide, artritis inducida por colágeno y enfermedades cardiovasculares.<sup>2</sup>

La *Porphyromona Gingivalis* es causante de múltiples problemas para el ser humano, por ser este un importante miembro de la microbiota periodontal involucrado tanto en la progresión de la periodontitis, como en los procesos de destrucción de hueso y tejido, enfermedades cardíacas, parto prematuro y bajo peso al nacer.<sup>3</sup>

Buscando nuevas alternativas de tratamiento a base de medicina tradicional, se encontró que la *Caléndula Officinalis* es una planta de uso cosmético, ornamental y medicinal, además, oriunda del Mediterráneo que crece violentamente durante todo el año; en cuanto a su uso medicinal, se presenta como infusión, tintura, aceite, extracto líquido, crema y ungüento. Debido a la presencia de sustancias biológicamente activas, en su materia prima, llamadas carotenoides, flavonoides, triterpenos, saponinas y un sin número de otras sustancias acompañantes; presenta propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antisépticas, cicatrizantes de heridas, anti fúngicas y antioxidantes.<sup>4</sup>

## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

### 1.2.1 Problema principal:

¿Cuál es la diferencia del efecto antibacteriano entre aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15% y la Clorhexidina 0.12% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis*. (Estudio in vitro).Lima-2019?

### 1.2.2 Problemas secundarios:

- ¿Cuál es el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15% a las 24, 48 y 72 horas frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis*. (Estudio in vitro).Lima-2019?

- ¿Cuál es el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas de la Clorhexidina 0,12% a las 24, 48 y 72 horas frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis*. (Estudio in vitro).Lima-2019?

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo general

Determinar la diferencia del efecto antibacteriano del aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* 15% comparado con la Clorhexidina 0,12% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* (estudio in vitro). Lima-2019.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

**Oe1.** Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de *Caléndula Officinalis* al 15% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* a las 24 horas. (Estudio in vitro). Lima-2019.

**Oe2.** Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de *Caléndula Officinalis* al 15% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* a las 48 horas. (Estudio in vitro). Lima-2019.

**Oe3.** Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de *Caléndula Officinalis* al 15% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* a las 72 horas. (Estudio in vitro).Lima-2019.

**Oe4.** Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas de la Clorhexidina 0,12% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* a las 24 horas (Estudio in vitro). Lima-2019.

**Oe5.** Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas de la Clorhexidina 0,12% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* a las 48 horas (Estudio in vitro). Lima-2019.

**Oe6.** Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas de la Clorhexidina 0,12% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* a las 72 horas (Estudio in vitro). Lima-2019.

**Oe7.** Comparar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas entre el aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* 15% y la Clorhexidina 0,12% frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* a las 24h, 48h y 72. (Estudio in vitro). Lima-2019.

#### 1.4 JUSTIFICACIÓN

La enfermedad periodontal es una enfermedad infecciosa de etiología bacteriana común en el ser humano que aqueja a nuestra población desde tiempos remotos, siendo la *Porphyromona Gingivalis* el microorganismo más importante encontrado en la periodontitis. Por ello el control de microorganismos con la ayuda de coadyuvantes de los métodos mecánicos; tales como sustancias antimicrobianas que disminuyan la carga bacteriana de la cavidad oral es de mucha importancia.<sup>5</sup>

La fitoterapia es una alternativa accesible, ventajosa y natural que cualquier profesional de la salud podría utilizar para la terapéutica y ponerlo en práctica no solo en prevención, sino también en el tratamiento de diversas patologías, reconocida a través de diversas investigaciones químicas, farmacológicas y sobre todo por los menores riesgos de toxicidad de los pacientes cuando se utilizan correctamente; más aun considerando que el 80% de la población ya lo usa en mayor o menor grado, dentro de sus costumbres en medicina tradicional peruana.<sup>6</sup>

La fitoterapia últimamente ha recibido mucha atención por parte de los investigadores, este tipo de medicina natural muestra que sustancias activas como los opioides, terpenos, taninos, flavonoides encontradas en especies vegetales que actúan de manera bactericida sobre ciertos microorganismos Gram negativos como es el caso de *Porphyromona Gingivalis*, harán que este estudio permita corroborarlo.<sup>4</sup>

Es así que partiendo de las costumbres ancestrales de las personas, estamos tratando de demostrar si esta planta (*Caléndula Officinalis*) es correctamente empleada o si sus efectos son reales y afecta a la bacteria que es importante en el campo de la odontología. Los resultados obtenidos serán un aporte para especialistas en periodoncia y estudiantes, para implementar información veraz acerca de un tratamiento antimicrobiano natural, complementario a la técnica de alisado y raspado radicular, lo cual implicará una mejoría en menos tiempo que la tradicional y con mayores beneficios.

## **1.5 VIABILIDAD**

- Este trabajo es viable debido a la fácil obtención de la *Caléndula Officinalis* ya que es una planta muy abundante en nuestro país.

### **1.1. LIMITACIONES**

- Dificultad para conseguir las cepas de *Porphyromona Gingivalis*
- Costo de los laboratorios para poder desarrollar la investigación.

## CAPÍTULO II

### 2 MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

**Parra R. Ecuador 2017. Efecto inhibitorio de extracto de *Caléndula Officinalis* vs Clorhexidina al 2% sobre cepas de *Staphylococcus Aureus*.**

El **objetivo** fue determinar el efecto inhibitorio del extracto acuoso de Caléndula Officinalis al 50% y 60% vs clorhexidina al 2% sobre cepas de *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923). Para lo cual se diseñó un estudio experimental in vitro. El primer **método** que utilizaron fue la obtención de extracto acuoso de Caléndula Officinalis en los porcentajes de 50% y 60%, de las plantas obtenidas en estado natural, se tomaron las flores sanas, sin presencia de gusanos ni alteraciones visible. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio Clínico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador donde se obtuvo de las flores lavadas, desinfectadas y secas en una proporción de 1:2 (1 parte de planta y 2 partes de solución extractora); la solución extractora estaba compuesta por 10% alcohol etílico potable y 90% de agua destilada, para este caso particular se partió de un peso de 25g de flores, un volumen de 5ml de etanol absoluto potable y de 45ml de agua destilada estéril caliente (60 °C), el alcohol se utilizó solo como un medio de preservación del extracto durante la obtención del mismo. Las flores junto con la solución extractora se las colocó en un recipiente de vidrio ámbar y se sometió a maceración con agitación continua por 72 horas, este es un proceso mediante el cual la solución extrajo los principios activos presentes en la planta la cual al estar en contacto continuo con la solución extractora logró que se produzca el fenómeno de difusión de los principios activos hacia el solvente hasta que se alcanzó un equilibrio, el cual se logró entre las 72 y 96 horas. Una vez obtenido el extracto se repitió el proceso con otro peso similar de flores nuevas. Ya obtenido el extracto se lo sometió a calentamiento por 30 minutos a temperatura de alrededor de 45 °C para concentrar el extracto; se

filtró y luego se dejó reposar por 24 horas. Después de ello se envasó en los recipientes previamente lavados y desinfectados; para ser sometidos a irradiación con el fin de eliminar la contaminación bacteriana. El proceso se realizó en la cámara de radiación ultravioleta por 1 hora. Se colocaron los discos necesarios en una caja Petri previamente rotulada para colocar la solución del extracto, clorhexidina y suero fisiológico en los mismos. Se aplicó las soluciones de los extractos de Caléndula en concentraciones de 60% y 50% a cada disco blanco de papel, mediante una micro pipeta digital calibrada a 20 ul; al igual que de clorhexidina al 2% y de suero fisiológico. Se colocó 4 discos embebidos de los extractos al 60% y 50% en las placas a una distancia no menor de 15mm entre sí y a 1,5 cm del borde de la placa. En el caso de la clorhexidina y el suero fisiológico se colocaron 5 discos embebidos en cada caja Petri al ser controles positivos y negativos, después se colocaron las placas en la incubadora de  $35 \pm 37$  °C. Tuvo como **resultado** que la inhibición de la caléndula al 50% fueron de 7,5mm, de la caléndula al 60% fue de 8,9mm, de la clorhexidina al 2% fue de 19,2mm y finalmente del grupo control suero fisiológico no presentó inhibición con valor de 0mm ni a las 24 ni 48 horas. Por lo tanto, se **concluyó** que tuvo un efecto inhibitorio límite de 8,9mm del extracto acuoso al 60% de Caléndula Officinalis, efecto inhibitorio nulo de 7,5mm del extracto al 50% de Caléndula Officinalis sobre cepas de Staphylococcus Aureus (ATCC 25923). Se comprobó una diferencia importante entre los cuatro grupos de estudio dando como resultado una mayor inhibición de la Clorhexidina al 2% como control positivo de un valor promedio de 19,2mm. <sup>7</sup>

**Maji S. et al. EE.UU 2017. Eficacia del extracto de *Caléndula Officinalis* (flor de caléndula) como agente antimicrobiano contra los microbios orales: un estudio in vitro en comparación con el Digluconato de Clorhexidina.**

La incorporación de extractos de plantas naturales en la terapia anti infecciosa periodontal es una sabia alternativa a la luz de la rampante resistencia a los antibióticos entre los patógenos periodontales. **Buscó** evaluar la eficacia antimicrobiana de C. Officinalis contra cinco microbios orales, en comparación

con el Digluconato de Clorhexidina. Se evaluó la acción inhibitoria de los dos agentes de prueba, clorhexidina Digluconato 0.2% y extracto crudo de *C. Officinalis* usando pruebas para determinar la concentración inhibitoria mínima, la concentración bactericida mínima y las zonas de inhibición usando el método de difusión en agar. El **método** de la curva de tiempo muerto se usó para evaluar el tiempo en que el fármaco fue inhibidor contra cinco microbios orales, a saber, *A. Actinomycetemcomitans*, *P. Gingivalis*, *P. Intermedia*, *F. Nucleatum* y *S. Mutans*. Obteniendo como **resultado** que la *P. Gingivalis* y *P. Intermedia* fueron sensibles a *C. Officinalis*, mientras que *F. Nucleatum* y *A. Actinomycetemcomitans* mostraron una sensibilidad reducida. *C. Officinalis* fue altamente eficaz contra *S. Mutans* (3.12 µg / mL), su concentración inhibitoria cercana a la del Digluconato de Clorhexidina 0.2% (6.25 µg / mL). *C. Officinalis* tomó más tiempo que el Digluconato de Clorhexidina 0.2% para exhibir la letalidad contra todos los organismos que inhibió. La Clorhexidina mostró letalidad inmediata (minuto cero) contra *S. Mutans* mientras que inhibió los otros microbios a los 5 minutos. *A. Actinomycetemcomitans* y *P. Intermedia* fueron inhibidos por *C. Officinalis* a los 30 minutos, *S. Mutans* a los 10 minutos. *F. Nucleatum* fue inhibido por *C. Officinalis* a las 2 horas. Llegando a la **conclusión** que la *C. Officinalis* mostró eficacia antimicrobiana contra la mayoría de los organismos analizados, pero su eficacia no fue a la par con el Digluconato de Clorhexidina al 0,2%. Sin embargo, su rendimiento todavía podría utilizarse como evidencia para estimular ensayos clínicos en humanos, en pacientes que se someten a terapias de fase I o IV. <sup>8</sup>

**Ayala D. Ecuador 2016. Efecto antibacteriano del aceite esencial de Margarita (*Caléndula Officinalis*) y Jengibre (*Zingiber Officinale*) vs. Clorhexidina al 2% sobre cepas de *Porphyromona Gingivalis*: estudio in vitro.**

**Buscó** determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de Jengibre y Margarita vs. Clorhexidina al 2% sobre cepas de *Porphyromona Gingivalis*. Usando un **tipo de Investigación** Experimental in vitro y comparativo. Se realizó la activación de las cepas de *Porphyromona Gingivalis*, como cepas indicadores o sensibles. Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y



del mismo tipo de morfología fueron seleccionadas de un agar de cultivo, se procede a la aplicación de los discos a las placas inoculadas, los discos fueron distribuidos en forma constante y no quedaron a menos de 24 mm de distancia entre los centros de cada uno. Las placas fueron invertidas y puestas en una campana de anaerobiosis y luego llevadas a la incubadora a 36°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos. Se aplicaron los aceites esenciales de Jengibre (*Zingiber Officinale*) y Margarita (*Caléndula Officinalis*) directamente de cada frasco hacia el disco de papel y posteriormente al medio de cultivo donde se encontraba sembrada la cepa. Como **resultados** finales se comprobó que el aceite esencial de Jengibre (*Zingiber Offinale*) si tiene un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Porphyromona Gingivalis*, obteniendo de las 16 muestras un 100% de efecto inhibitorio, con un promedio de 11.5mm de halo de inhibición, ubicándose en una sensibilidad límite (+). Mientras que el aceite esencial de Margarita (*Caléndula Officinalis*) obtuvo un efecto inhibitorio mínimo obteniendo un promedio de 5mm de halo de inhibición y ubicándose como un efecto nulo (-). La Clorhexidina al 2% obtuvo un promedio de 22mm de halo de inhibición dando como resultado un efecto sumamente sensible (++++) en comparación a la Clorhexidina al 0,12% que obtuvo un promedio de 16mm de halo de inhibición con una sensibilidad media (++). Se **concluyó** que el aceite esencial de Jengibre posee un mayor efecto antibacteriano sobre cepas de *Porphyromona Gingivalis* que el aceite esencial de Margarita. Al comparar los halos inhibitorios del aceite esencial de Jengibre y Clorhexidina al 0.12% sobre las cepas de *Porphyromona Gingivalis*, se concluye que no presentan una diferencia estadísticamente significativa.<sup>9</sup>

#### 1.1.1. Antecedentes nacionales

**Manrique L. Perú 2016. Efectividad antimicrobiana de la Clorhexidina y la *Caléndula Officinalis* en las suturas de seda negra 3/0 pos Exodoncia.**

Este estudio se tuvo como **objetivo** determinar la efectividad antimicrobiana de la clorhexidina al 0.12%, *Caléndula Officinalis* al 15%, al 20% en las suturas de seda negra 3/0 pos exodoncia de terceras molares impactadas en

comparación al grupo control, de **nivel** experimental, analítico, prospectivo, longitudinal y de campo. Fueron seleccionados 80 pacientes (n=20 pacientes por grupo), pos exodoncia se proporcionó un tratamiento enjuagatorio antimicrobiano bajo la metodología triple ciego. Después de siete días las suturas fueron retiradas y transportadas al especialista en microbiología en un tubo de ensayo estéril con 2 ml de suero fisiológico. Las suspensiones, diluciones y siembra en las placas Petri con los medios de cultivo fueron realizadas dentro de las 12 horas. Se trabajó con agar Manitol Salado para el cultivo de *Stafilococcus Aureus*, agar Cromogénico *Cándida* para *Cándida Albicans*, agar Mitis Salivarius para *Streptococcus spp*, agar Mitis Salivarius más bacitracina para *Streptococcus Mutans*, y agar MacConkey para Enterobacterias. Los medios de cultivo fueron incubados de 24-48 horas a 37 °C para el conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). **Resultado** de ello se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la reducción de UFC/ml de *Streptococcus spp*. entre las comparaciones de grupos; sin embargo, no se pudo especificar en cual comparación ocurrió la significancia. Se encontró una mayor reducción de UFC/ml bajo el tratamiento con clorhexidina 0.12%, seguido del tratamiento con *Caléndula Officinalis* al 20%. La enterobacteria más frecuente fue *Klebsiella Pneumoniae* presentando una reducción numérica mayor de UFC/ml bajo el tratamiento con *Caléndula Officinalis* al 20%, seguido del tratamiento con *Caléndula Officinalis* al 15%. Llegando a la **conclusión** de que los tratamientos enjuagatorios antimicrobianos: clorhexidina al 0.12%, *Caléndula Officinalis* al 15% y 20% poseen mayores reducciones numéricas en las cantidades de UFC/ml de *Stafilococcus Aureus*, *Cándida Albicans*, *Streptococcus spp.*, *Streptococcus Mutans* y las especies de Enterobacterias en comparación al tratamiento placebo control. Existe diferencia estadísticamente significativa en la reducción de UFC/ml de *Streptococcus spp.*, con mayor reducción numérica de colonias bajo el tratamiento de clorhexidina al 0.12%, seguido del tratamiento de *Caléndula Officinalis* al 20%.<sup>10</sup>

**Montenegro C, Ramos P. Perú 2016. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia Spinosa* (tara) sobre *Porphyromonas Gingivalis*.**

**Buscó** determinar la actividad antibacteriana in vitro de cinco concentraciones (6,25; 12,5; 25; 50 y 75 mg/mL) del extracto alcohólico de la *Caesalpinia Spinosa* “tara” (EACS) sobre *Porphyromona Gingivalis*. El **estudio** de este trabajo fue de tipo experimental, prospectivo, comparativo e in vitro, y se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Realizaron la difusión en placa para enfrentarlas a las soluciones del extracto alcohólico de *Caesalpinia Spinosa* y compararlas con el control positivo Clorhexidina 0,12% y control negativo Alcohol 96°. Como **resultado** se determinó que la concentración del extracto alcohólico de *Caesalpinia Spinosa* tiene efecto antibacteriano sobre *Porphyromona Gingivalis*, aunque el aumento de la concentración no guarda una relación proporcional con el aumento de diámetro del halo de inhibición. **Por lo tanto** si se evidenció un efecto antibacteriano sobre *Porphyromona Gingivalis*.<sup>11</sup>

**Garcia K. Perú 2015. Efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia Sinensis* (té verde) usada como colutorio, sobre placa bacteriana y saliva.**

Las hojas de té verde (*Camellia Sinensis*), presentan en su composición flavonoides, a los que se le adjudica efecto antibacteriano; por otro lado es conocida la gran microbiota presente en la cavidad bucal, parte de la cual se encuentra en saliva y en placa dental, es así que este trabajo **buscó** investigar y determinar el efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia Sinensis* (té verde) usada como colutorio, sobre placa bacteriana y saliva. La infusión fue preparada al 20 % w/v a 90 °C, siendo aplicada a 84 alumnos de nivel secundario (grupo experimental); otros 84 alumnos constituyeron el grupo control (enjuague con solución salina). El efecto antibacteriano fue determinado mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en cultivos de placa dental y saliva; tomadas tanto antes de la aplicación de la infusión, inmediatamente después y a los 10 minutos. Como **resultado** se encontró efecto antibacteriano de la infusión tanto en placa bacteriana

como en saliva ( $p < 0.01$ ); además el efecto se prolongó hasta 10 minutos después de la aplicación ( $p < 0.01$ ). **Concluyendo** así que existió efecto antibacteriano de la infusión sobre placa bacteriana.<sup>12</sup>

### 2.1.2 Antecedentes locales

**Recinez S. Huánuco 2018. Eficacia antibacteriana in vitro del extracto de la *Caesalpinia Spinosa* “tara” en comparación con la Clindamicina frente a la *Porphyromona Gingivalis*. Hospital Materno Infantil Carlos Showing Ferrari, Huánuco 2017.**

El **objetivo** de esta investigación fue evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del extracto de la *Caesalpinia Spinosa* “Tara” en comparación con la Clindamicina frente a la *Porphyromona Gingivalis*. Es de **nivel**, explicativo de tipo; experimental, prospectivo, longitudinal, analítico. Las muestras estuvieron conformadas por: 3 placas de medios de cultivo Agar Sangre, 24 placas de medios de cultivo Agar Müller Hinton y 1 placa de medio de cultivo Agar Müller Hinton para la prueba piloto; se preparó el extracto de *Caesalpinia Spinosa* “Tara” en cuatro concentraciones 25%, 50%, 75% y 100%. Los **resultados** obtenidos mostró una actividad antibacteriana del extracto de la *Caesalpinia Spinosa* “Tara” al 100% con 24.38mm durante las primeras 24h, un mayor efecto a las 48h dando una media inhibitoria de 25.50mm y prevaleciendo su efecto hasta las 72h con un promedio de 26.75mm; a diferencia del efecto obtenido por Clindamicina 60 mg/mL que fue superior su capacidad inhibitoria a las 24h estableciendo una media de 28.75mm, conforme el transcurso del tiempo hasta las 72h, este efecto fue en aumento de manera considerable mostrando una media de 29.63mm y 30.00mm respectivamente. Llegando a la **conclusión** de que el extracto de *Caesalpinia Spinosa* “Tara” al 100% en comparación con la Clindamicina (60 mg/mL) poseen un efecto antibacteriano análogo según la escala de Duraffourd, frente a la *Porphyromona Gingivalis*.<sup>13</sup>

**Belsuzarry C, Valderrama D. Huánuco 2015. Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Pelargonium X Hortorum* L.H. Bailey sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis*.**

Este trabajo de investigación se realizó con el **objetivo** de evaluar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Pelargonium x Hortorum* L. H Bailey en diferentes concentraciones sobre cepas de *Porphyromona* *Gingivalis* y compararlos con el Gluconato de Clorhexidina al 0,12%. El **nivel** de investigación es Aplicativo – Explicativo; de tipo experimental, comparativo, in vitro, cuantitativo, prospectivo, transversal y por controles. Se determinó usando el **método** de difusión en pozo, se emplearon 25 cultivos de *Porphyromona* *Gingivalis* ATCC 33277, las cepas se incubaron en anaerobiosis a 37° por 72 horas. Para la dilución del extracto se empleó Dimetilsufóxido (DMSO), que también fue usado como control negativo junto con el agua destilada, luego cada una de las diluciones se comparó con el Gluconato de Clorhexidina al 0,12%, los halos de inhibición se midieron a las 72 horas. Los **resultados** mostraron que el promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto etanólico de *Pelargonium X Hortorum* a 6,25 mg/ml es de 3,68 mm; a 12,5 mg/ml es de 5,50 mm; a 25 mg/ml es de 7,18 mm y a 50 mg/ml es 11,44 mm y el Gluconato de Clorhexidina al 0,12% fue 10,32 mm. En **conclusión** el extracto etanólico de *Pelargonium x Hortorum* a 50mg/ml presentó mayor efectividad antibacteriana sobre cepas de *Porphyromona* *Gingivalis*, incluso mayor efectividad que el Gluconato de Clorhexidina al 0,12%.<sup>14</sup>

**Espejo B, Ruiz G. Huánuco 2015. Efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Piper Aduncum* (matico) frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis*. Estudio in vitro. Lima 2014.**

Este trabajo **busca** determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del *Piper Aduncum* (matico) frente a cepas de *Porphyromona* *Gingivalis* in vitro. Es un **estudio** de tipo experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo; para lo cual se utilizaron 20 cultivos de

Porphyromona Gingivalis. En las muestras se midió el halo de inhibición según los objetivos marcados y finalmente se compararon dichas medidas. Se procesó las hojas secas para obtener el extracto etanólico, a partir de la masa de extracto seco de Piper Aduncum se prepararon concentraciones de 0.5%, 0.25% y 0.062% las que fueron preservadas en frascos color ámbar estéril y conservado en refrigeración.

Los **resultados** demostraron que, el promedio del diámetro de los halos de inhibición sobre la Porphyromona Gingivalis a las 72 horas del extracto de Piper Aduncum al 0.5% fue de 8,65mm, para el de 0.25% fue de 6,25mm y en menor diámetro para el de 0.062% es de 4,8mm y a las 96 horas para el de extracto de Piper Aduncum al 0.5% fue de 16.25mm, para el de 0.25% fue de 10.95mm y en menor diámetro para el de 0.062 % es de 7.35mm. Por lo tanto se **concluye** que el extracto etanólico de Piper Aduncum (matico) tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de Porphyromona Gingivalis y en las diferentes concentraciones de 0.5%, 0.25% y 0.062% %, independientemente, muestran un efecto inhibitorio.<sup>15</sup>

## 2.2 BASES TEÓRICAS Y CIENTÍFICAS

### PORPHYROMONAS GINGIVALIS

Es una especie anaerobia Gram- negativa, negra, pigmentada que reside en el biofilm sub gingival. Se ha demostrado que este organismo tiene la capacidad de invadir y sobrevivir dentro de las células eucariotas; también es reconocido como un contribuyente para el desarrollo de las infecciones periodontales acompañado de otros patógenos orales ya que posee un sin fin de factores de virulencia especializados.<sup>16</sup>

Es el patógeno principal de la periodontitis juvenil generalizada y en la periodontitis crónica con una prevalencia del “40-100”%, es el patógeno más relevante, localizándose en mayor concentración a nivel de las bolsas profundas.<sup>17</sup>

### TAXONOMÍA

El género Bacteroides, agrupó en su primera clasificación, un conjunto de bacterias heterogéneas, con características de ser anaerobios obligados, gram negativo, no esporulados y de forma bacilar con la aplicación de

nuevas técnicas de identificación a base de biología molecular, como el ADN-ADN hibridación, y estudio de sus características bioquímicas, se pudo identificar un grupo homogéneo de especies a partir de los bacteroides, llamados ahora Porphyromona, que en sus inicios estuvo formando por 3 especies, *P. Gingivalis*, *P. Asaccharolyticus* y *P. Endodontales*. Estas especies presentaban la característica de ser no fermentadores, utilizar como sustrato el nitrógeno y obtener su energía a partir de tripticasa y peptona.<sup>18,19</sup> Estudios posteriores a base de la secuencia de rRNA de 16S, han alejado más genealógicamente del género Bacteroides, conociéndose en la actualidad alrededor de 12 especies, habiendo una, *P. Catoniae*, que es sacarolítica.<sup>20</sup>

## **MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA**

*P. Gingivalis*, bacilo corto o coco bacilo, anaerobio estricto, Gram negativo que puede medir de 0.5 a 0.8 um por 1- 3.5 um es considerado un comensal en la cavidad oral.<sup>21</sup>

A nivel de la membrana externa de la pared celular presenta la endotoxina, son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos. Presenta vesículas a nivel superficial conteniendo una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también producen múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.<sup>22,23</sup>

## **FACTORES VIRULENCIA Y CRECIMIENTO DE LA P. GINGIVALIS.**

Los principales factores de virulencia de *P. Gingivalis* incluyen fimbrias, cápsula, vesículas de membrana externa, lipopolisacárido (LPS), los metabolitos tóxicos y proteinasas.<sup>24</sup>

- **Cápsula:** constituido por polisacáridos, siendo un gen codificante de epimerasa epsC esencial para su síntesis, existiendo 6 serotipos capsulares de K1 – K6. Esta juega un rol importante en la evasión del sistema

inmunológico, eludiendo la fagocitosis, opsonización y accionar del complemento.<sup>25</sup>

- **Endotoxina (LPS):** Presente en la membrana externa de la bacteria, compuesta en parte por el lípido A, que estaría participando en la interrupción de la homeostasis inmunológica del huésped, ocasiona inflamación gingival, asociada con la destrucción del tejido conectivo y la reabsorción del hueso alveolar por activación de osteoclastos y causa la liberación de prostaglandinas E2 , así como un incremento de IL18 y IL1B.<sup>26</sup>
- **Vesículas de membrana externa:** Son sacos cerrados que se encuentran a un nivel más externo de la bacteria, presentan en su interior numerosas enzimas como; fosfolípasa C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas, lipopolisacaridos. Estas son liberadas, produciendo daño a las células periodontales y neutrófilos.<sup>27</sup>
- **Hemaglutininas:** Son proteínas codificadas por el gen hag y estas pueden ser 5 de A-E, promueven la colonización por mediación de la unión bacteriana a receptores oligosacaridos en células humanas.<sup>25</sup>
- **Fimbrias:** Presentes en forma peritrica de 0.3 a 3.0 um de largo y 5 nm de ancho, compuestos por monómeros de fimbrilina, codificados por el gen fimA, pudiéndose clasificar en 6 variantes, del tipo I al V y el Ib. Estas presentan capacidad de unirse a diferentes sustratos, moléculas, y células, como epitelial, fibrinogeno, fibronectina, lactoferrina. A su vez presenta propiedades quimiotácticas y de inducción de citoquinas. Se ha podido detectar a las P. gingivales con fimbrias fimA tipo II y IV en la progresión de la periodontitis y a las de tipo I, V en adultos sanos.<sup>21</sup>
- **Proteínasas cisteinproteasas:** Son compuestos bacterianos que proporcionan nutrientes para el crecimiento bacteriano, produciendo un daño colateral al huésped, degradando colágeno de diferentes tipos. Estas proteínas son llamadas gingipainas, produciendo el 85 % de la actividad



proteolítica generada por *P. Gingivalis* y el 100 % de la actividad tipo tripsina. Las gingipainas son productos de 3 genes *rgpA*, *rgpB*, *Kgp*. Se ha podido determinar que entre las acciones que producen están; la degradación de fibronectina, fibrinógeno y de las uniones de las células epiteliales, activación del sistema de coagulación y sistema calicreina – quinina. Interrumpen en la defensa del huésped al degradar IL, un importante quimiotáctico y C3 cuya activación produce C3a y C3b, este último un potente opsonizante.<sup>21</sup>

- **Proteínas no cisteinproteasas:** Estas son la colagenasa, proteasa, hemaglutinina, una enzima tipo convertora de endotelina, una dipeptidilpeptidasa y la periodontaina, esta última, degrada las proteínas desnaturalizadas y los polipéptidos<sup>25</sup>.
  
- **Inductor de metaloproteinasas de la matriz:** No es un producto generado por *P. Gingivalis*, pero si lo induce, para que sea producida por fibroblastos, leucocitos y macrófagos. Estas metaloproteinasas degradan la mayoría de moléculas de la matriz extracelular, como el colágeno, fibronectina y la laminina. *P. Gingivalis* inactiva los inhibidores tisulares de metaloproteinasas, específicamente el tipo 1, que tiene mucha relación con la destrucción del colágeno tipo I y fibronectina.<sup>25</sup>

**Tabla 1.** Factores de virulencia de *Porphyromona Gingivalis* relacionados con la destrucción del tejido del huésped.

## FISIOPATOLOGÍA

*P. Gingivalis* es conocido también como comensal del surco gingival y colonizador secundario, que llega por medio de la saliva a ser contagio o transmisión por individuos infectados.

Tiene la capacidad de adherirse principalmente por sus fimbrias peritricas tipo Ib, II así como por sus vesículas de membrana, hemaglutininas, cápsula, le permiten dar el primer paso en la colonización del surco, poder

adaptarse e invadir las células epiteliales en aproximadamente de 20 minutos.

Esta característica de invadir la célula, le da la capacidad de evadir las defensas del huésped y tiene la capacidad de degradar diversas proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, además de alterar la respuesta innata y específica del anfitrión. Posee el factor huésped, que ante la presencia de esta bacteria, activa una diversidad de respuestas que pueden incrementar el proceso inflamatorio, presente en el surco, haciendo crónico el proceso de destrucción del periodonto.<sup>20</sup>

## **MEDIO DE CULTIVO DE LAS BACTERIAS**

### **AGAR SCHAEDLER**

El Agar Schaedler Sangre de carnero con Vitamina K1, es un medio altamente nutritivo, no selectivo, para el aislamiento y cultivo de bacterias exigentes estrictamente anaeróbicas de muestras clínicas.

#### **PRINCIPIO**

El Agar Schaedler sangre, es un medio con alto contenido nutritivo, enriquecido con vitamina K1 y hemina, especialmente desarrollado para el crecimiento de anaerobios estrictos como *P. Gingivalis*. *T. Fosythia*, *T. Denticola*, AAA.

Las fuentes nutritivas de peptonas son de tres orígenes, la glucosa es la fuente energética. El tampón Tris evita el descenso extremo del pH que genera la fermentación de la glucosa. El extracto de levadura es la fuente de vitaminas, la hemina y sangre de carnero suministran los grupos hemo y fuentes de sustancias necesarias para gran variedad de anaerobios estrictos. La presencia de vitamina K1 ha sido incluida al ser un requerimiento para el crecimiento de la *Prevotella melaninogenica* (*Bacteroides melaninogenicus*) y el cloruro sódico que aporta electrolíticos esenciales.<sup>28</sup>

## ANTISÉPTICOS

### **CLORHEXIDINA AL 0.12%**

La Clorhexidina (CLHX) es uno de los antisépticos más empleados por estomatólogos y odontólogos. Es una diguanidina o biguanida que representa uno de los desinfectantes mejor conocidos y de uso más extendido, por su eficacia y tolerancia. Su espectro antimicrobiano alcanza a bacterias gram positivas y gram negativas.<sup>29</sup>

Se utiliza como enjuagues bucales además de en la boca, la clorhexidina se utiliza para limpiar la piel del campo operatorio, lavar las heridas e implantes dentales.<sup>29</sup>

### **MECANISMO DE ACCIÓN**

Debido a sus propiedades catiónicas se une a la hidroxiapatita del esmalte, a la película adquirida y a las proteínas salivales. La Clorhexidina absorbida se libera gradualmente, esto ocurre entre las 12 a 24 horas después de su absorción, con lo que se evita la colonización de bacterias en este lapso.<sup>30</sup>

Desestabiliza y penetra la membrana de las células bacterianas, precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que origina una disminución del trifosfato adenosin y la muerte celular, el efecto bactericida de la clorhexidina se da en la unión a la pared celular de las bacterias, la cual en bajas concentraciones causa una alteración del equilibrio osmótico de la bacteria dando un efecto bacteriostático; mientras que en altas concentraciones su acción bactericida se debe a una precipitación de proteínas y ácidos nucleicos<sup>30</sup>

## **ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS**

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, dímero proguanil por lo que decimos que es una bisguanida, está conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: Paraclorofenilbiguanida.<sup>31</sup>

Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a PH superior a 3.5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica la que lo hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios colaterales y su dificultad para formularla en productos. Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en su forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua.<sup>30</sup>

## **FARMACOCINÉTICA**

Los estudios indican que aproximadamente el 30 % del principio activo, se retiene en la cavidad oral después del enjuague, la clorhexidina retenida se libera lentamente en los fluidos orales, lo que no ocurre al ser ingerido (tracto gastrointestinal) ya que demuestra escasa absorción del fármaco.<sup>30</sup>

Los niveles plasmáticos de clorhexidina alcanzan un pico máximo de 0.206 microgramos por gramo en humanos, 30 minutos después de la ingestión de 300 mg de clorhexidina. No se encontraron niveles, detectables en plasma de clorhexidina después de 12 horas de la ingesta. La excreción de clorhexidina se realiza fundamentalmente por las heces (90 %); menos del 1 % se excreta por la orina.<sup>30</sup>

## **INDICACIONES**

Indicado como agente anti placa, para el tratamiento de gingivitis y periodontitis, en cirugía periodontal, como irrigador en alveolitis, como desinfectante en estomatitis por dentaduras (candidiasis subplaca), como tratamiento de ulceraciones aftosas y como coadyuvante en halitosis. Su uso se recomienda dos veces al día, como enjuague oral debe ser usado por lo menos 30 segundos. No se debe ingerir y debe expectorarse después de enjuagarse.<sup>29</sup>

## CALÉNDULA OFFICINALIS

Véase **Figura 01**. Margarita (Caléndula Officinalis) en su forma silvestre.

### **HISTORIA**

Denominada como marigold en inglés debido a una leyenda que data de la edad media asociada a la Virgen María con doradas flores de Caléndula (gold); etimológicamente deriva de latín “calendae” que según la antigua Roma significa primer día del mes por encontrarse esta flor en este día.<sup>32</sup>

### **DEFINICIÓN**

La Caléndula Officinalis es una planta anual que se cultiva en todo el mundo y sus flores son utilizadas de manera ornamental para la preparación de productos en la industria farmacéutica y cosmética.<sup>33</sup>

### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

Planta herbácea, aromática, glandular, puede ser anual o perenne; pertenece a la familia de las compuestas, más o menos pelosa y leñosa, su tamaño oscila entre los 30 a 60 cm o 30 a 50 cm de altura<sup>34</sup>. Presenta una raíz de forma ahusada su tallo es rígido, difuso o procumbente, erecto, trepador, ramificado en su parte inferior; hojas casi hasta el ápice de color verde, alternas, simples, poco gruesas, oblongas a obovado-oblongas, enteras o diminutas, vellosas y algo dentadas, estrechamente obovadas; flores individuales en pedúnculos robustos, vistosos de 3,75 a 5 cm de diámetro; pétalos de color amarillo blanquecino hasta anaranjado oscuro, que se cierran por la noche. Florece de julio a septiembre<sup>34,35</sup>

Véase **Figura 02**: *C. Officinalis* from Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, by Thomé, 1885

## PROPIEDADES

Posee propiedades antiinflamatorias, antiespasmódicas, emenagogas, colagogas, sedativas, sudoríficas, vulnerarias y bactericidas contra *Staphylococcus Aureus* y *Staphylococcus Fecalis*.<sup>36</sup> Se dice también que la *Caléndula Officinalis* es el verdadero antiséptico homeopático. Algunas propiedades terapéuticas de la *Caléndula Officinalis* son: antiséptica, cicatrizante, emoliente, anti ulcerosa, antiespasmódica, acción sobre quemaduras de primer grado y alteraciones de la dermis.<sup>37</sup>

## COMPOSICIÓN QUÍMICA

En los estudios realizados se demuestra que la composición química de la *C. Officinalis* está condicionada por la variedad de planta<sup>38</sup>, por factores ambientales, como cultivo, clima, tipo de suelo por el tratamiento, recolección y extracción del material vegetal.<sup>39</sup>

Los estudios fitoquímicos confirman que los principales constituyentes químicos de las flores de caléndula destacan los flavonoides (libres y glucosilados), terpenos (saponósidos y alcoholes triterpénicos, triterpenos y sesquiterpenos), carotenoides, polisacáridos, ácidos fenólicos, cumarinas y aceite esencial.<sup>38</sup> Se detectó en ella también la presencia de esteroides, taninos, aceites esenciales, esteroides, saponina, pigmentos, umbeliferona, esculetina, escopoletina, carotenoides, ácido salicílico, fenólico, entre otros.<sup>38</sup>

Los flavonoides y las saponinas presentan propiedades antiinflamatorias (en edemas donde intervienen las prostaglandinas) y cicatrizante (acción estimulante del epitelio de las heridas), antibacteriana, antifúngica y antiviral. Los polisacáridos tienen acción antitumoral, estimulando la fagocitosis de los polimorfonucleares.<sup>38</sup>

## USOS Y APLICACIONES

- 1) **Uso medicinal:** La medicina tradicional describen el uso de las flores de *C. Officinalis* para el tratamiento externo de cortes superficiales, inflamaciones menores de la piel y de la mucosa bucal, heridas y *ulcus cruris*, también se describe su uso para el tratamiento de la amenorrea, angina de pecho, fiebre, gastritis, hipotensión, ictericia, reumatismo y

vómitos en la medicina popular, sin evidencias experimentales o clínicas.<sup>40</sup>  
El modo de empleo en la medicina tradicional es la administración tópica en forma de infusión, extracto líquido, tintura o aceite.<sup>40</sup>

Véase. **TABLA 02:** Determinaciones analíticas del extracto acuoso de Caléndula Officinalis; Águila

- 2) **Uso en medicina tradicional:** Las flores de Caléndula Officinalis tienen un amplio espectro en cuanto al tratamiento de diversas enfermedades, entre las que podemos citar de una forma selectiva las siguientes: para la curación de las heridas, como colutorios en estomatitis, piorrea y úlceras; a nivel cardiaco en el tratamiento de la hipertensión, taquicardia y arritmia; afecciones del sistema urinario, enfermedades del Sistema Nervioso Central y del Sistema Nervioso Periférico, entre otras. Acción externa e interna sobre todas las heridas traumáticas produciendo la cicatrización rápida e impidiendo la supuración.<sup>41</sup>
- 3) **Uso de aplicación interna:** Mediante infusiones tiene una acción estimulante de actividad hepática, secreción biliar y úlceras gástricas.<sup>41</sup>
- 4) **Uso de aplicación externa:** Tinturas o pomadas utilizadas en escaras, úlceras varicosas, erupciones cutáneas y otras afecciones de la piel.<sup>36</sup>
- 5) **Uso en cosmetología:** Forma parte de lociones, cremas, jabones y champús.<sup>41</sup>
- 6) **Uso en alimentación:** Se utiliza como colorante elaborado con sus flores y pétalos, pétalos secos y machacados como colorantes y condimento o sus pétalos frescos en ensaladas.<sup>36</sup>
- 7) **Uso en cavidad oral:** En cavidad oral posee un alto efecto cicatrizante por la proliferación fibroblástica en el área lesionada posterior a la pérdida de continuidad de las mucosas presenta una baja toxicidad, al igual que presenta acciones antiinflamatorias y antimicrobianas, se utiliza en heridas



anfractuosas y desgarradas con tendencia a la supuración y dolor excesivo; como por ejemplo en boca sería una erupción traumática del tercer molar inferior.<sup>41</sup>

Como enjuague bucal para tratar las aftas bucales con una solución de 30 gotas en medio vaso de agua a temperatura ambiente después de las 3 comidas al día por aproximadamente una semana.<sup>34</sup> Soluciones de 25 gotas de tintura de *C. Officinalis* en medio vaso de agua hervida sobre las úlceras crónicas inflamadas, úlceras cancerosas, esta solución evita el dolor inmediato e impide el desarrollo de intoxicación.<sup>42</sup>

## **FARMACOLOGÍA**

Diversos estudios farmacológicos confirman que las flores de *C. Officinalis* poseen varias actividades, que explican sus usos tradicionales y la posibilidad de futuras aplicaciones en medicina.<sup>38</sup>

## **PROPIEDADES MEDICINALES:**

- 1) Actividad antiinflamatoria, antiedematosa y cicatrizante :** La inhibición de la inflamación fue demostrada, en el modelo de edema auricular inducido por TPA en ratones, para varias fracciones, siendo la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico la de mayor poder inhibitorio (84 %), y para algunos glucósidos triterpénicos del tipo oleanano aislados de esa fracción.<sup>43</sup> También se demostró la reducción del edema auricular inducido por aceite de croton para ésteres de faradiol y  $\psi$ -taraxasterol aislados y la reducción de la inflamación, dependiente de la dosis, en el modelo de edema plantar de rata inducido por carragenina para el extracto acuoso<sup>44</sup>. La actividad cicatrizante del extracto etanólico en ratas, fue comprobada en quemaduras térmicas y mucositis oral, por vía tópica, y en heridas inducidas por punción, por vía oral, apreciándose mejoría significativa en el proceso curativo.<sup>45</sup> En ensayos clínicos en humanos, una pomada a base de caléndula resultó altamente efectiva para la prevención de la dermatitis aguda durante la radiación contra el cáncer de pecho, un aceite con extracto de caléndula parece acelerar la curación con efectos positivos sobre la epitelización de las úlceras venosas de

las piernas y un enjuague bucal parece efectivo en la reducción de la intensidad de la mucositis orofaríngea producida por la radiación, aunque no la previene completamente.<sup>45</sup>

- 2) **Actividad anti-VIH y antiviral:** El extracto en diclorometano de las flores de caléndula causó la reducción de la actividad de la transcriptasa inversa del HIV-1, lo que sugiere actividad anti-VIH. La tintura de las flores suprimió la replicación de los virus del herpes simple, influenza A2 e influenza APR-8 in vitro.<sup>46</sup>
- 3) **Actividad antibacteriana y anti fúngica:** El extracto metanólico de las flores de caléndula demostró actividad antibacteriana contra bacterias periodontales, anaerobias y facultativas. Los resultados mostraron inhibición para *Porphyromonas Gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Veillonella parvula*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros* y *Actinomyces odontolyticus* (MIC  $\geq$ 2048 mg/L) y para *Prevotella* spp (MIC  $\leq$ 2048 mg/L). Los extractos metánolicos y etanólicos mostraron actividad antimicrobiana, mediante el método de difusión de disco, frente a hongos y bacterias gram-positivas y gram-negativas como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.<sup>47</sup> El aceite esencial también mostró buena actividad antifúngica, mediante el método de difusión de disco, frente a *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* y *Rhodotorella* spp.<sup>48</sup>
- 4) **Actividad inmunoestimulante e inmunomoduladora:** Polisacáridos aislados de extractos de caléndula mostraron actividad inmunoestimulante, al mejorar la fagocitosis de granulocitos humanos, mediante varios test inmunológicos in vitro.<sup>49</sup> El extracto etanólico (70 %) de caléndula reveló actividad inmunomoduladora, por la capacidad para mejorar la proliferación de linfocitos después de la estimulación con células alogénicas. Los resultados no mostraron actividad mitogénica directa sobre los linfocitos o timocitos

humanos, pero si un efecto inhibitorio completo sobre la proliferación de linfocitos en presencia de PHA y un efecto estimulante sobre una mezcla reactiva de linfocitos (MLR).<sup>50</sup>

### 2.3 DEFINICIÓN DE CONCEPTOS BÁSICOS

- **Efecto antibacteriano:** Capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias (bacteriostático) o su eliminación (bactericida) sin dañar el organismo infectado, como los antibióticos.
- **Actividad antimicrobiana:** Acción de una o más sustancias que impiden o no, el desarrollo de los microorganismos como bacterias, hongos, protozoos y virus.
- **Actividad antibacteriana:** Es la acción que ejerce una sustancia en el desarrollo o crecimiento de las bacterias.
- **Bacteria anaerobia:** Bacteria que se desarrolla en condiciones donde existe una mínima o nula cantidad de oxígeno, como una bolsa periodontal.
- **Concentración:** Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen.
- **Halo De Inhibición:** Zona alrededor de un disco embebido de aceite esencia de *Caléndula Officinalis* en el que no se produce crecimiento bacteriano.
- **Caléndula Officinalis:** planta crecida en los países del Mediterráneo de uso ornamental, cosmético y medicinal. Debido a sus componentes activos se le atribuyen propiedades antimicrobianas, analgésicas, antiinflamatorias, cicatrizantes, antiespasmódicas, antioxidantes y coleréticas.
- **Acción Anti fagocitaria:** inhibir la acción de ciertas células u organismos unicelulares: alimentarse de algo por fagocitosis.
- **Anaerobio:** Dicho de un ser vivo: Que puede vivir sin oxígeno.
- **Anafilaxis:** anafilaxia. Sensibilidad exagerada del organismo debida a la acción de ciertas sustancias orgánicas.
- **Biofilm:** Agregado de microorganismos con abundantes relaciones ecológicas entre ellos.

- **Cepas:** Grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común desconocida.
- **Endotoxina:** Toxina retenida en el cuerpo vivo de las bacterias que no se separa de ella sino por disgregación de las mismas
- **Gingivitis:** Inflamación patológica de las encías.
- **Hidratos de Carbono:** Sustancia orgánica formada por carbono, hidrógeno y oxígeno, en la que estos dos últimos elementos se encuentran en la proporción de dos a uno.
- **Hidrolizar:** Desdoblamiento de una molécula por la acción del agua.
- **In Vitro:** Producido en el laboratorio por métodos experimentales.
- **Lipopolisacárido (Lps):** Polímero complejo con restos de ácidos grasos.
- **Microbiota:** Fauna y flora microscópica de una región; biota microscópica
- **Naturaleza Polisacárida:** Hidrato de carbono formado por una larga cadena de monosacáridos
- **Proteasas:** Enzima que fragmenta las proteínas.
- **Sustrato:** Sustancia sobre la que actúa una enzima.
- **Enzima:** Sustancia proteínica que actúa como catalizador de procesos metabólicos.

## 2.4 HIPÓTESIS

### 2.4.1 Hipótesis de la investigación

**HI:** El aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15% posee mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina 0.12% frente a cepas de *Porphyromona Gingivalis* (estudio in Vitro).Lima-2019.

### 2.4.2 Hipòtesis nula

**HO:** El aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15% no posee mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina 0.12% frente a cepas de *Porphyromona Gingivalis* (estudio in Vitro).Lima-2019.

## **2.5 VARIABLES**

### **2.5.1 Variable independiente.**

Tipo de solución:

- Aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15%
- Clorhexidina 0.12%
- Suero fisiológico 5ml.

### **2.5.2 Variable dependiente:**

- Efecto en las Cepas de *Porphyromona Gingivalis* ATCC® 33277™

## 2.6 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES. <sup>51</sup>

VARIABLES	INDICADOR	CATEGORIA	ESCALA	INSTRUMENTO
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>				
Tipo de Solución	Aceite de <i>Caléndula Officinalis</i> 15%	0	Cualitativa	Guía de observación o ficha de recolección de datos.
	Clorhexidina 0,12%	1	Nominal	
	Suero fisiológico 5ml			
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>				
Efecto en las cepas de <i>Porphyromona Gingivalis</i> ATCC® 33277™	Inhibición del crecimiento (halos de inhibición) a las 24 horas.		Cuantitativa	Medición de halos de inhibición en mm según Duraffourd.
	Inhibición del crecimiento (halos de inhibición) a las 48 horas.			
	Inhibición del crecimiento (halos de inhibición) a las 72 horas.			

**Cuadro N° 03.** Tabla de Variables. Según Supo J. Seminario de Investigación Científica: Metodología de la investigación para las ciencias de la Salud. Arequipa 2012.

## CAPÍTULO III

### 3 MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1 NIVEL, TIPO DE INVESTIGACIÓN.

##### 3.1.1 Nivel:

- **Explicativo:** Explica el comportamiento de una variable en función de otra(s); por ser estudios de causa- efecto requieren control y debe cumplir otros criterios de causalidad. Según Supo J. Seminario de Investigación Científica: Metodología de la investigación para las ciencias de la Salud. Arequipa 2012.

##### 3.1.2 Tipo:

###### a. SEGÚN LA INTERVENCION DEL INVESTIGADOR

- **Experimental:** Porque requiere manipulación rigurosa de variables o factor experimental.<sup>51</sup>

###### b. SEGÚN LA PLANIFICACION DE LA TOMA DE DATOS

- **Prospectivo:** Porque los datos serán registrados conforme a la ocurrencia de los hecho.<sup>51</sup>

###### c. SEGÚN EL NUMERO DE OCASIONES EN QUE MIDE LA VARIABLE DE ESTUDIO

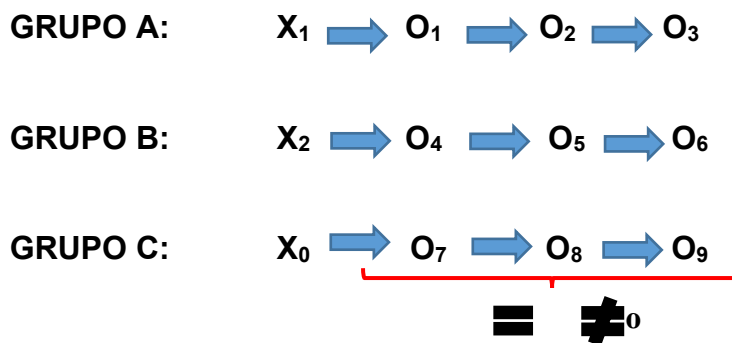
- **Longitudinal:** Porque la recolección de datos fue tomada en varios momento.<sup>51</sup>

###### d. SEGÚN EL NÚMERO DE VARIABLES DE INTERES

- **Analítico:** El análisis estadístico por lo menos es bivariado, porque plantea y pone a prueba hipótesis, su nivel más básico establece la asociación entre factores.<sup>51</sup>

### 3.2 DISEÑO Y ESQUEMA DE LA POBLACIÓN

Diseño experimental de dos grupos de series temporales y grupo control.



**X** = Variable dependiente: Efecto en las cepas de *Porphyromona Gingivalis*.

**O** = Observación (24 horas ,48 horas y 72 horas).

**G** = Grupo de estudio:

- Grupo A experimental: Aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15%.
- Grupo B control positivo: Clorhexidina 0.12%.
- Grupo C control: Suero fisiológico 5ml.

### 3.3 DETERMINACIÓN DE POBLACIÓN Y MUESTRA

#### 3.3.1 Población

- No refiere población al ser un trabajo in vitro.

#### 3.3.2 Muestra

- 24 placas en medios de cultivo Agar Schaedler con *Porphyromona Gingivalis* ATCC® 33277TM.



### 3.4 TIPO DE MUESTREO:

- Muestreo no probabilístico por conveniencia.

### 3.5 UNIDADES DE ANALISIS

- Pocillos con 40uL de aceite esencial de *Caléndula Officinalis* al 15% y 40uL de Clorhexidina al 0.12% sobre cultivos de cepas de *Porphyromona Gingivalis* ATCC® 33277TM.
- Se utilizaron cepas de *Porphyromona Gingivalis* ATCC® 33277™
- La muestra de *Caléndula Officinalis* se recolectará del centro poblado de San José de Uchpas, distrito de San Francisco de Cayran, provincia de Huánuco, región Huánuco.

### 3.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

#### 3.6.1 Criterios de Inclusión

- Cultivos de *Porphyromona Gingivalis* de la misma cepa.
- Cepas de *Porphyromona Gingivalis*, mantenidos en condiciones adecuadas de temperatura, medios de cultivo, manipulación.
- Pétalos de flores de *Caléndula Officinalis* frescas sin contaminación.
- Medios de cultivo Agar Schaedler esterilizados sin contaminación.
- Cajas Petri debidamente verificadas, sin fracturas y estériles.

#### 3.6.2 Criterios de Exclusión

- Cepas que no pudieron ser cultivadas.
- Plantas de *Caléndula Officinalis* que estén deterioradas.
- Aceite esencial de *Caléndula Officinalis* sobre *Porphyromona Gingivalis*, que hayan sufrido contaminaciones.
  - Medios de cultivo Agar Schaedler no esterilizados y contaminados.

### 3.7 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

#### 3.7.1 Técnica:

- **Observacional:** tiene cierto carácter experimental y comprende la observación minuciosa y detallada de un fenómeno en un sitio especialmente previsto para hacer la observación.

#### TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO:

- **OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *CALENDULA OFFICINALIS* 15%**

##### ➤ RECOLECCION DEL MATERIAL VEGETAL

Recolección de la planta *Caléndula Officinalis*. Las plantas fueron sembradas, cosechadas y recolectadas de un huerto en el centro poblado de San José de Uchpas, distrito de San Francisco De Cayran, provincia de Huánuco, región Huánuco. La recolección fue realizada a las 12 pm ya que a esa hora aproximadamente las gotas de rocío terminan de evaporarse (**Figura 3**).

Se recolectaron aproximadamente 3kg de planta fresca de *Caléndula Officinalis* descartando aquellas que se encontraban en mal estado; las cuales fueron acondicionadas para ser trasladadas a la ciudad de Lima, al Laboratorio de Anatomía Farmacognosia Vegetal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (**Figura 4**).

Se tomó una maceta de la planta *Caléndula Officinalis* la cual fue llevada al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para que se realice el estudio taxonómico correspondiente con el objetivo de estandarizar la muestra, confirmando que se trataba de la planta que se requería para el trabajo de investigación. (**Anexo 01**).

##### ➤ LIMPIEZA Y SELECCIÓN

En el Laboratorio de Anatomía Farmacognosia Vegetal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se procedió a la separación de cada una de las

partes de la planta, eliminando todo rastro de tierra y seleccionando el material con el que se trabajara para la realización del aceite esencial de *Caléndula Officinalis*. **(Figura 05)**.

#### ➤ **PESO Y DESECACIÓN DE LA PLANTA**

Retiramos el receptáculo de la inflorescencia quedándonos con las flores de la planta, ya que de esta parte se obtendrá el aceite, la cual fue pesada en una balanza gramera para obtener información del peso en fresco y luego ser comparado con el peso en seco para tener una aproximación de la cantidad de aceite resultante

Para la desecación se llevó a la estufa a 37°C por 4 días con el fin de eliminar microorganismos y detener su deterioro. **(Figura 06)**.

#### ➤ **MARCHA FITOQUIMICA**

Una vez obtenida las flores secas se tomó 50gr de la muestra la cual fue mezclada con 1000ml de solución hidroalcohólica (60%) en un balón de base plana, se agito y se tapó dejándolo reposar por un periodo de 10 días en un ambiente oscuro en este caso en una incubadora agitando esporádicamente el contenido para el posterior estudio de marcha fitoquímica. **(Anexo 2)**

#### ➤ **PREPARACIÓN DEL ACEITE DE *CALÉNDULA OFFICINALIS* 15%.**

Para la obtención del aceite se utilizó el procedimiento de SISTEMA DE ARRASTRE DE VAPOR- HIDRODESTILACIÓN:

1. Se colocó en un matraz Erlenmeyer 50gr de muestra con 1600ml de agua destilada. **(Figura 07)**.
2. Se acopla un sistema refrigerante (baño circulante en frio) alimentado con agua destilada a temperatura de 10°C constantes **(Figura 08)**.

3. El matraz Erlenmeyer con el contenido fue colocado sobre una cocinilla eléctrica sometiéndolo a una temperatura mayor de 100°C hasta alcanzar el proceso de ebullición por el lapso de 50 minutos a 1h aproximadamente, se obtiene por densidad las gotas de esencia en la parte superior y en la parte inferior el agua. **(Figura 08).**
4. Se procede a separar el líquido del aceite (decantación) que se encuentra contenido en un embudo de doble vía. Se utiliza el solvente *Acetato de etilo* que nos facilitara la remoción de aceite que quedo impregnada en las paredes internas del embudo. Se realiza un segundo proceso de decantación para eliminar la mayor cantidad de agua restante. **(Figura 09 y 10).**
5. Una vez obtenido el aceite con el solvente *Acetato de Etilo* se colocó en un vaso de precipitación pequeño de capacidad de 50 ml al cual se le añadió *Sulfato de Sodio Anhídrido* con el fin de que esta absorba el agua restante; se dejó reposar por 3 días mientras se iba obteniendo más mezcla y al 4to día se trasvaso por decantación el *Acetato de Etilo* con el aceite dejando la fase acuosa para evitar pasar agua y agregar más *Sulfato de Sodio Anhídrido*; luego se colocó en la Campana extractora por 3 horas a temperatura ambiente con fuerza de succión suave para facilitar la volatilización del solvente. Finalmente se dejó reposar por 2 días a temperatura ambiente dando como resultado el aceite esencial puro de *Caléndula Officinalis* **(Figura 11).**
6. Se determina el volumen de aceite para obtener relación peso volumen donde concluimos que 5 µL equivale a 5.5mg aproximadamente.
7. Se utilizó *Dimetil Sulfoxido* como vehículo de dilución para obtener el aceite al 15% de la siguiente manera: **(Figura 12).**

Formula ( $C1V1=C2V2$ ) donde: 279 µL (aceite de *Caléndula Officinalis* puro) equivale al 100%.

$$100\% \cdot 279 \mu\text{L} = 15\% \cdot X$$

$$X=1860 \mu\text{L}$$

$$Y= 1860 \mu\text{L} - 279 \mu\text{L} (\text{aceite puro}) = 1581 \mu\text{L} (\text{Dimetil Sulfoxido})$$

## **OBTENCIÓN DE LA BACTERIA**

Se compró la bacteria *Porphyromona Gingivalis* iofilizado en el laboratorio reconocido THERMO SCIENTIFIC.

### ***Porphyromona Gingivalis* ATCC® 33277™**

Temperatura de almacenaje Congelado: 80° C o más frío liofilizado: 2° C a 8° C

Descripción del producto: La cepa es parte de un conjunto de organismos de control de calidad de los productos BioMerieux Vitek.

Propagacion: medio: Suplemento Caldo de Tripticasa Soya / Agar Schaedler

Temperatura: 37° C

Atmosfera: mezcla de gas anaeróbico, el 80% N210% CO210% H2

#### **➤ REACTIVACIÓN DE LA CEPAS DE *P. GINGIVALIS* ATCC® 33277™**

Para la Reactivación de la cepa de *Porphyromona Gingivalis* ATCC® 33277™ se abrió el vial de acuerdo a las instrucciones adjuntas y se inoculo en el tubo de ensayo que contenía caldo de Tripticasa Soya realizando movimiento de rotación utilizamos el Vortex para homogenizarlo y se colocó en la incubadora a 37° C de 15 a 20 minuto aproximadamente en condiciones anaerobias. (Figura13, 14 y 15).

#### **➤ SIEMBRA DE *PORPHYROMONA GINGIVALIS* ATCC® 33277™**

Con ayuda del asa fueron sembradas por aislamiento en dos placas Petri contenidas con Agar Schaedler por diseminación con un hisopo estéril sobre toda el área de la placa Petri (Figura 16), fueron colocadas en una jarra de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis, fueron incubadas por un lapso de 8 a 10 días a 37°C para su reconstitución (todo procedimiento se realizó en condiciones estériles) (Figura 17).

El sembrado de la cepa se realizó usando un mechero Bunsen el cual brindo un área de esterilización para evitar la contaminación de las placas Petri.

#### ➤ **CULTIVO DE LA CEPA DE P. GINGIVALIS**

Luego de los 10 días se verifico el aspecto general del medio y la aparición del crecimiento sobre la superficie del agar Schaedler, se observaron colonias marrón oscuro, circulares de tamaño regular, convexas y de superficie lisa brillante (Figura 18).

#### ➤ **ELABORACION DEL PROYECTO EN SI**

Utilizando un asa de siembra estéril se tomó 3 a 4 colonias de *Porphyromona Gingivalis* y se diluyo en un tubo de ensayo con 6ml de caldo nutritivo (tioglicolato) haciendo movimientos de rotación, hasta obtener una dilución de 0,5 de Mc Farland, que es equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. (Figura 19, 20).

#### **1.7.1.1.1 PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

Una vez realizada la siembra, con un socavado se procede a la elaboración de 3 pocillos de 40uL de capacidad en cada placa Petri. La distribución de los pozos se realizó de la siguiente manera: 01 pocillo para el aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15%, 01 pocillo para la clorhexidina 0,12% (control positivo) y 01 pocillo para el suero fisiológico 0.9% (control negativo). (Figura 21).

Se marcó en la base de las placas Petri el tipo de solución para cada pocillo, de la misma manera se enumeró cada una con números arábigos del 1 al 24 en relación al número de placas para evitar confusiones en las observaciones. (Figura 22).

#### ➤ **SIEMBRA DE LA MUESTRA**

Se procedió a realizar la siembra de *Porphyromona Gingivalis* por diseminación utilizando un hisopo estéril en las placas Petri conteniendo agar

Schaedler. Utilizando una micropipeta calibrada de 40uL, se aplicaron en cada pocillo las soluciones correspondientes de Aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15%, Clorhexidina 0,12% (control positivo) y Suero Fisiológico 0.9% (control negativo) y se dejó reposar por 10 minutos antes de incubarlo. (Figura 23, 24).

Las 24 placas Petri fueron selladas con parafilm para evitar una posible contaminación y se procedió la colocación de las placas Petri en las jarras de anaerobiosis incorporándole un sobre generador de anaerobiosis y cerrándolas herméticamente para después llevarlas a la incubadora a 37° C por 24h, 48h y 72h tiempo en las cuales se realizarán las observaciones y mediciones respectivas. . (Figura 25 y 26).

#### ➤ **MEDICIÓN DEL DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO.**

Los datos de los halos de inhibición serán registrados de modo manual, mediante la ayuda de una regla milimetrada y viendo a contra luz se realizó la lectura de los halos de inhibición por cada solución al cabo de las primeras 24, 48 y 72 horas. Los datos obtenidos fueron descritos en una ficha elaborada por las investigadoras que posteriormente serán ingresados y organizados en Microsoft Excel. (Figura 27 y 28).

#### **3.7.2 Instrumento:**

- **Guía de observación , ficha de recolección de datos**

Documento que nos permitirá encausar la acción de ciertos fenómenos. Esta ficha, por lo general se estructura a través de columnas que favorecen la organización de los datos recogidos.

- **Medición de halos de inhibición en mm según Duraffourd.**

Para la interpretación de los resultados en la evaluación se tomará como referencia los diámetros de halo de inhibición y las pautas por Durafford.<sup>52</sup>

- Nula (-) si fue inferior a 8 mm
- Sensible (sensible = +) de 9 a 14 mm
- Muy sensible (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm
- Sumamente sensible (S.S.=+++)) si fue igual o superior a 20mm

### **INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Para la presente investigación se elaboró un instrumento que será llenado por los investigadores permitiendo la recolección de la información para el cual fue destinado; el mismo tuvo ciertas características y permitirá realizar anotaciones q se mencionan a continuación:

- Fecha de inicio del ensayo
- Identificación de cepa bacteriana en estudio
- Identificación del tipo de planta y la concentración en este caso Aceite esencial de Caléndula Officinalis 15%
- Identificación de la sustancia control, la cual le da mayor confiabilidad a las lecturas del estudio, ya q permite comparar lo halos de inhibición formados.
- Identificación de sustancia de control negativo, en este caso Suero Fisiológico
- Horarios en las cuales se realizaron las observaciones y medición de los halos de inhibición de cada solución en las cuales se permitirá recolectar los datos

### **VALIDACIÓN DE LA FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.**

**Los datos fueron recolectados en la ficha de recolección de datos ( Anexo 07 )** se realizó la validación del instrumento por juicio de expertos, medio útil para verificar la fiabilidad de la investigación mediante una opinión informada de personas con trayectoria en el tema que dan información, evidencia, juicios y valoraciones.



## **3.8 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.**

### **3.8.1 Análisis de los resultados**

#### **Estadística paramétrica:**

**ANOVA (1F):** Uso de ANOVA de una vía para comparar los promedios. Puede utilizar ANOVA de una vía para evaluar si existe una diferencia significativa entre grupos de medias. ANOVA presupone que existe homogeneidad de varianza, es decir, que la varianza dentro de cada uno de los grupos es equivalente.

## CAPITULO IV

### 4 PRESENTACION DE RESUTADOS

#### 4.1 ANÁLISIS UNIVARIADO

**Tabla N°1. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO).**

GRUPO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
Caléndula Officinalis	24	33.33%
Clorhexidina	24	33.33%
Cloruro de sodio	24	33.34%
Total	72	100.00%

**Fuente:** Guía de observación

**Gráfico N°1. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO).**



En la tabla N°1, se observa el 100.00%(72) observaciones de la muestras de estudio, 33,33(24) observaciones del grupo experimental A (Caléndula Officinalis), 33,33(24) observaciones del grupo experimental B (Clorhexidina) y 33,33(24) observaciones del grupo experimental C (Cloruro de sodio).

**Tabla N°2. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 24 horas.**

**Tabla N°2.1. Grupo experimental A (Caléndula Officinalis)**

<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	0	0.00%
9 a 14 mm	14	58.3%
15 a 19 mm	10	41.7%
>= 20 mm	0	0.00%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.0%</b>

**Tabla N°2.2. Grupo experimental B (Clorhexidina)**

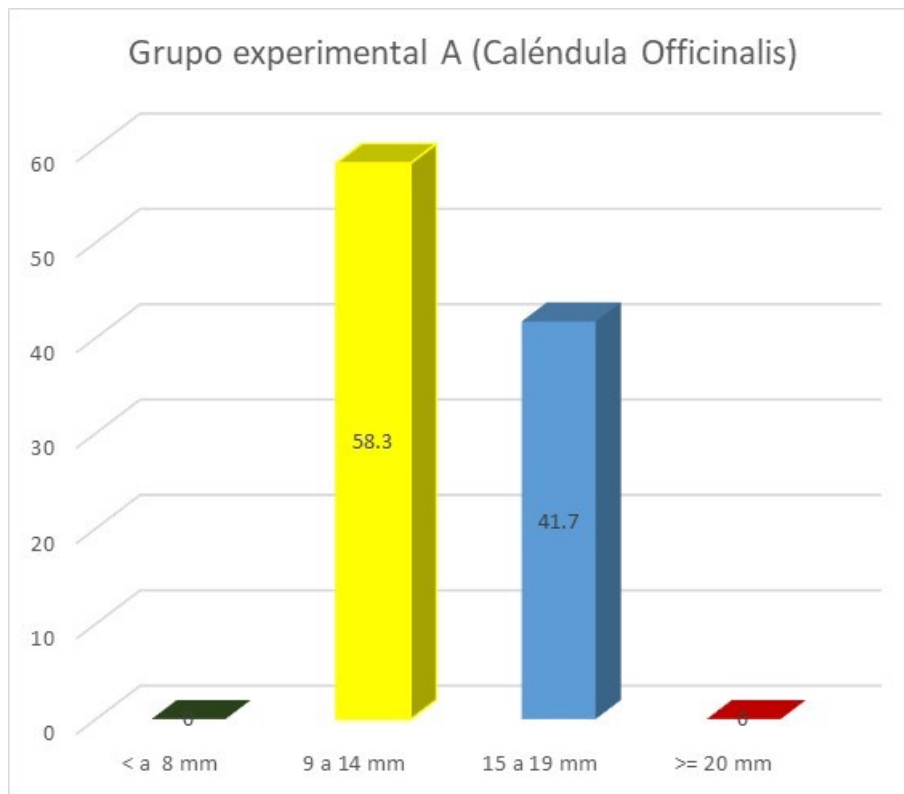
<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	0	0.00%
9 a 14 mm	24	100.0%
15 a 19 mm	0	0.00%
>= 20 mm	0	0.00%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.00%</b>

**Tabla N°2.3. Grupo control (Cloruro de sodio)**

<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	0	0.00%
9 a 14 mm	0	0.00%
15 a 19 mm	0	0.00%
>= 20 mm	0	0.00%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.0%</b>

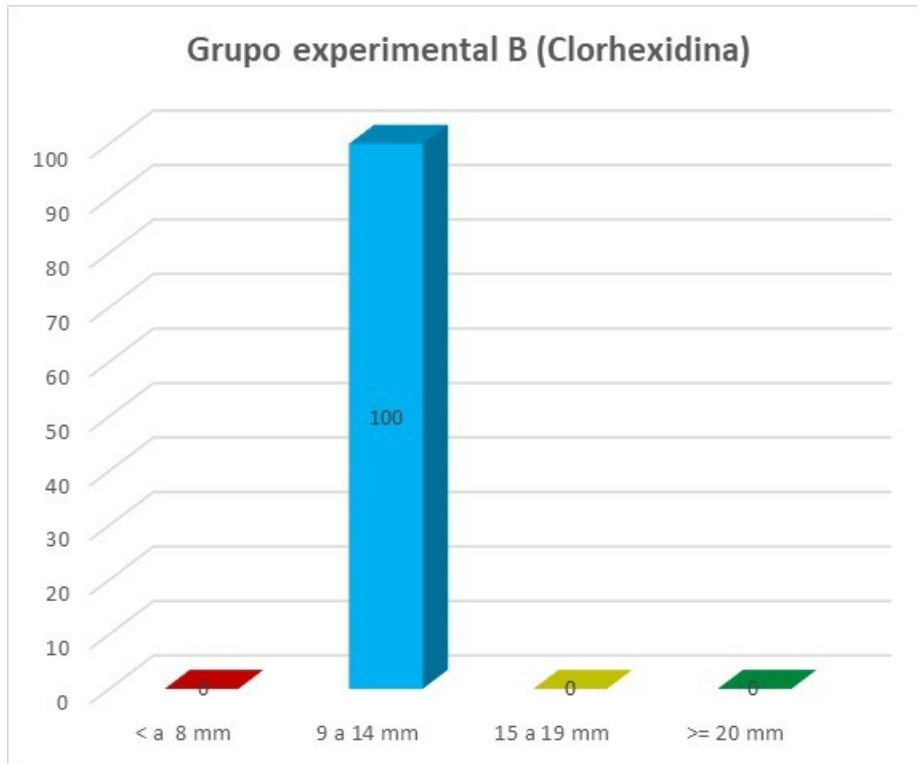
**Fuente:** Guía de observación.

**Gráfico N°2.1. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 24 horas.**



En la tabla N°2.1, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 58,3%(14) presenta categoría de 9 a 14 mm, 41.7% (10) presenta categoría de .15 a 19 mm.

**Gráfico N°2.2. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 24 horas.**



En la tabla N°2.2, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 24.0%(100) presenta una categoría de 9 a 14 mm.

**Gráfico N°2.3. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 24 horas.**



En la tabla N°2.3, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 0,00%(0) presenta todas las categorías.

**Tabla N°3. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 48 horas.**

**Tabla N°3.1. Grupo experimental A (Caléndula Officinalis)**

<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	0	0.00%
9 a 14 mm	4	16.7%
15 a 19 mm	13	54.2%
>= 20 mm	7	29.2%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.00%</b>

**Tabla N°3.2. Grupo experimental B (Clorhexidina)**

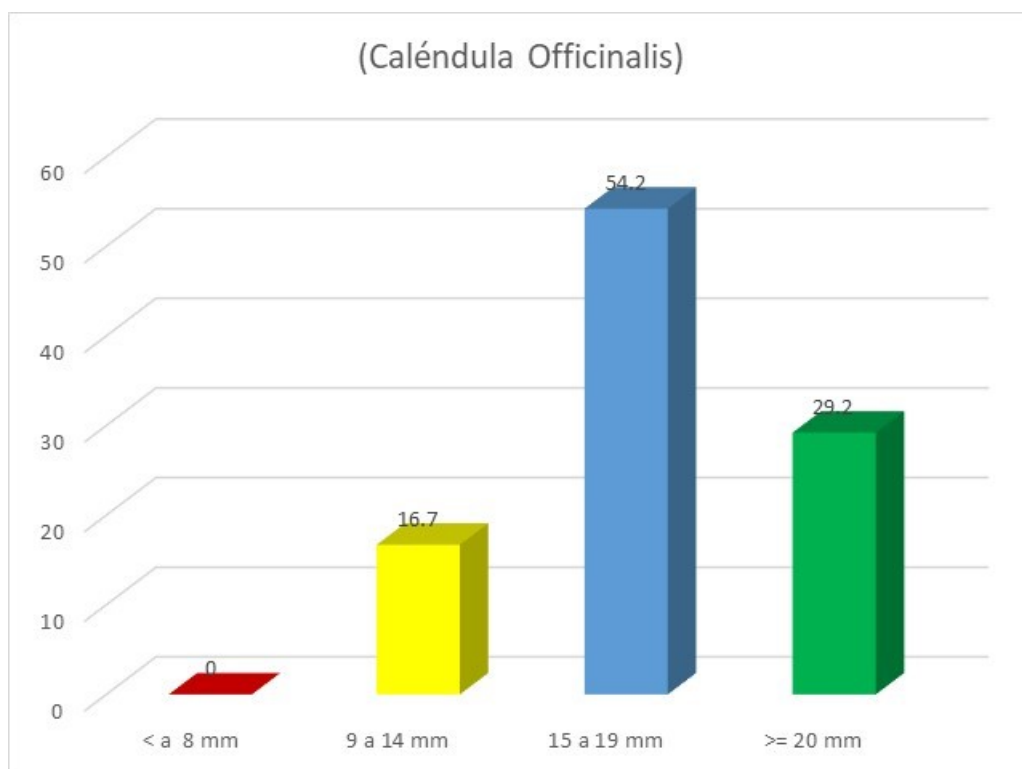
<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	0	0.00%
9 a 14 mm	21	87.5%
15 a 19 mm	3	12.5%
>= 20 mm	0	0.00%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.00%</b>

**Tabla N°3.3. Grupo control (Cloruro de sodio)**

<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	0	0.00%
9 a 14 mm	0	0.00%
15 a 19 mm	0	0.00%
>= 20 mm	0	0.00%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.00%</b>

**Fuente:** Guía de observación

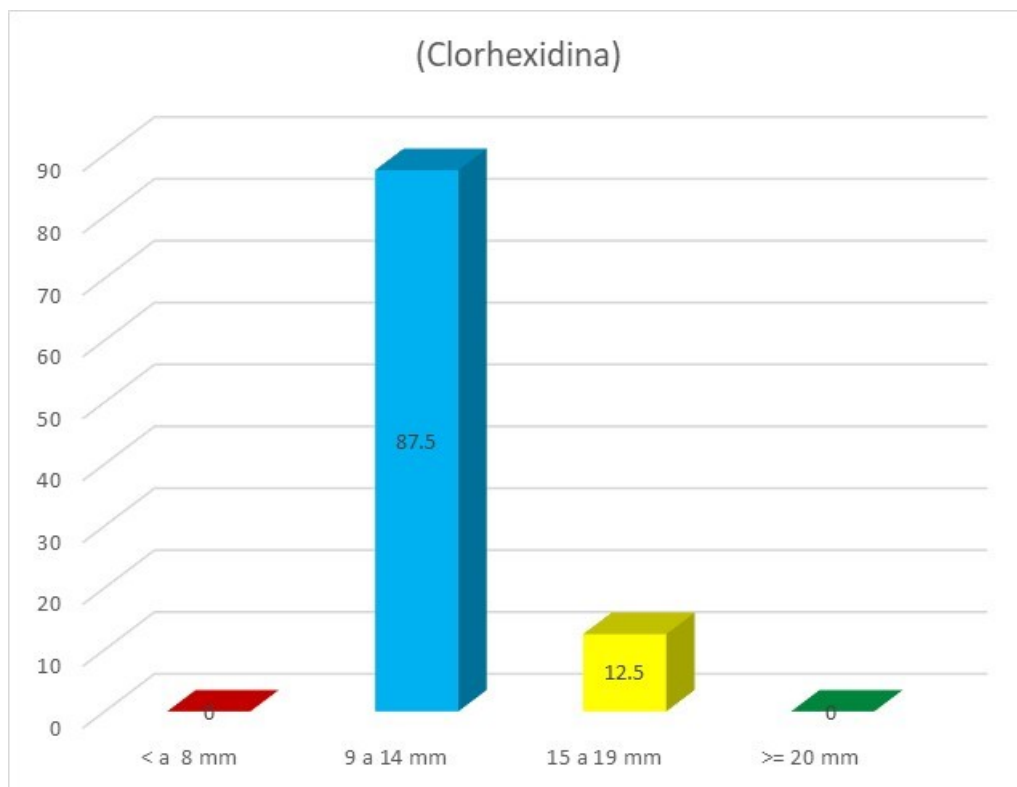
**Gráfico N°3.1. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 48 horas.**



En la tabla N°3.1, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 54.2%(13) presenta una categoría 15 a 19 mm, 29.2% (7) presenta una categoría  $\geq$  20 mm, 16.7%(4) presenta una categoría de 9 a 14 mm y 0,0(0) presenta una categoría de < a 8 mm.

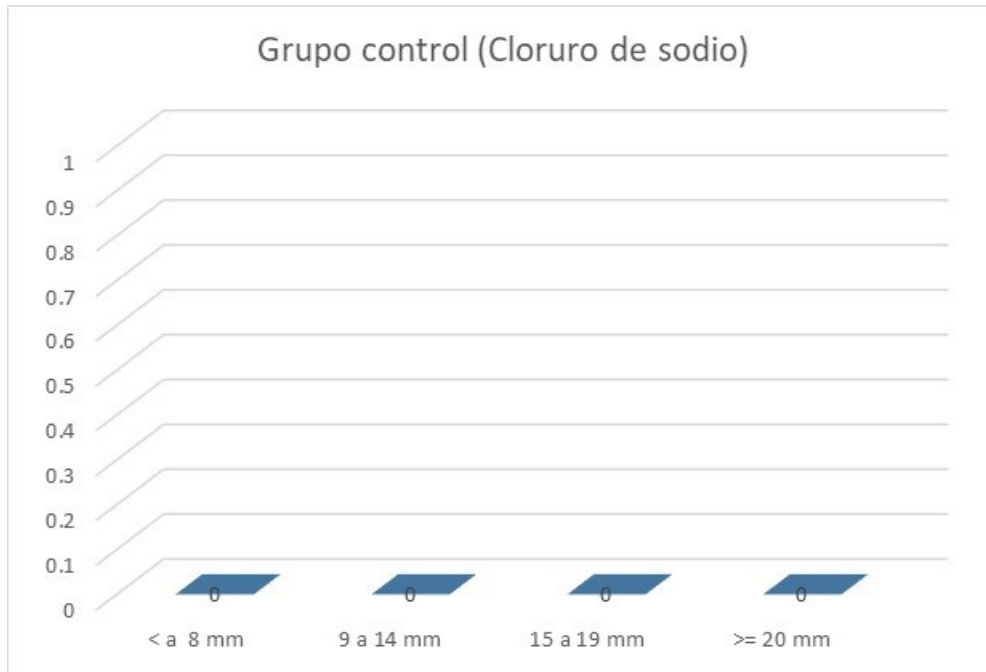


**Gráfico N°3.2. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 48 horas.**



En la tabla N°3.2, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 87.5%(21) presenta una categoría de 9 a 14 mm, 12.5%(3) presenta una categoría de 15 a 19 mm y 0,0%(0) presenta una categoría de < a 8 mm y >= 20 mm.

**Gráfico N°3.3 Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 48 horas.**



En la tabla N°3.3, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 0,00%(0) presenta todas las categorías.

**Tabla N°4. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 72 horas.**

**Tabla N°4. 1. Grupo experimental A (Caléndula Officinalis)**

<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	4	16.7%
9 a 14 mm	0	0.00%
15 a 19 mm	3	12.5%
>= 20 mm	17	70.8%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.00%</b>

**Tabla N°4. 2. Grupo experimental B (Clorhexidina)**

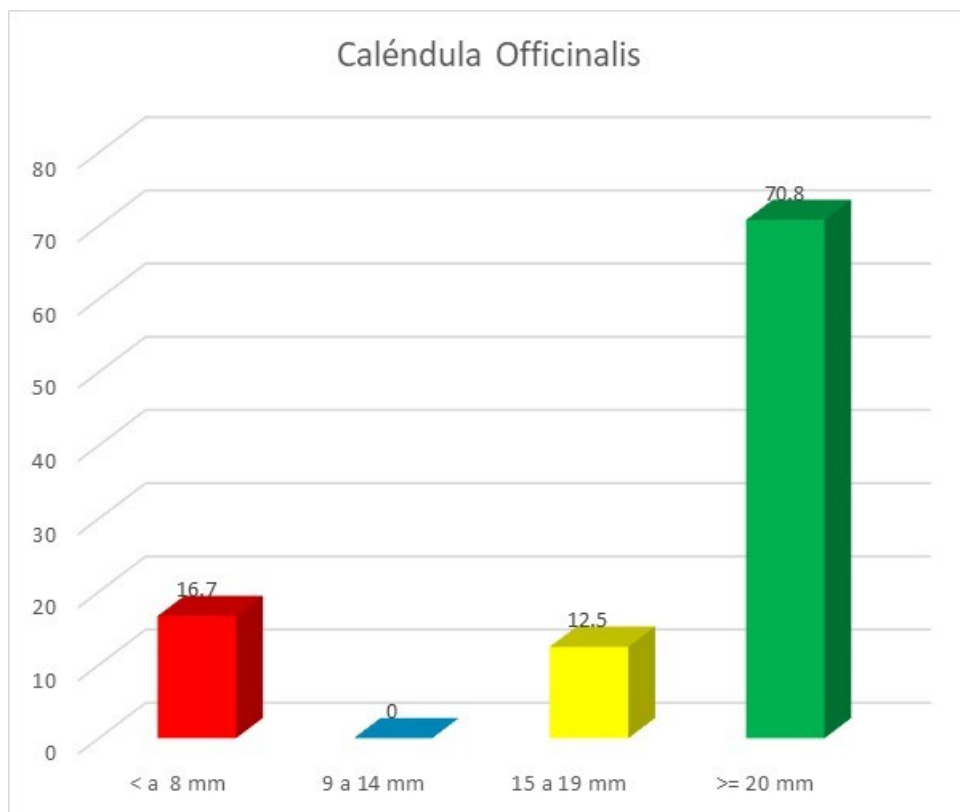
<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	4	16.7%
9 a 14 mm	5	20.8%
15 a 19 mm	15	62.5%
>= 20 mm	0	0.00%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.0%</b>

**Tabla N°4. 3. Grupo control (Cloruro de sodio)**

<b>Categoría</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
< a 8 mm	0	0.00%
9 a 14 mm	0	0.00%
15 a 19 mm	0	0.00%
>= 20 mm	0	0.00%
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100.00%</b>

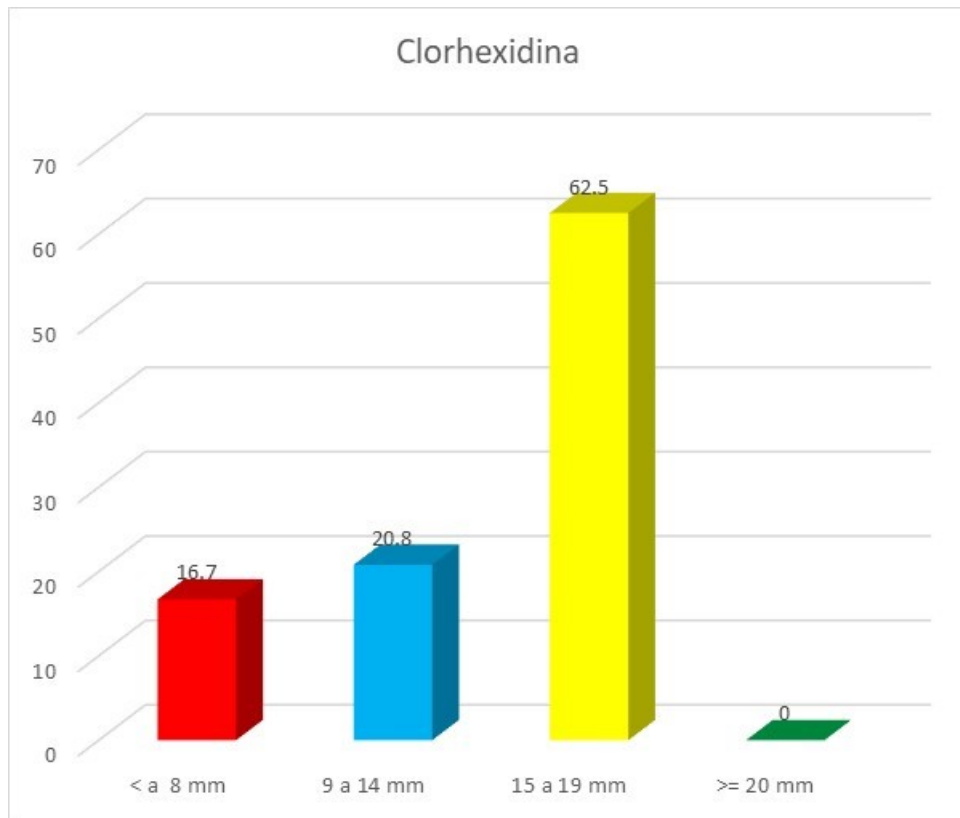
**Fuente:** Guía de observación

**Gráfico N°4.1. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 72 horas.**



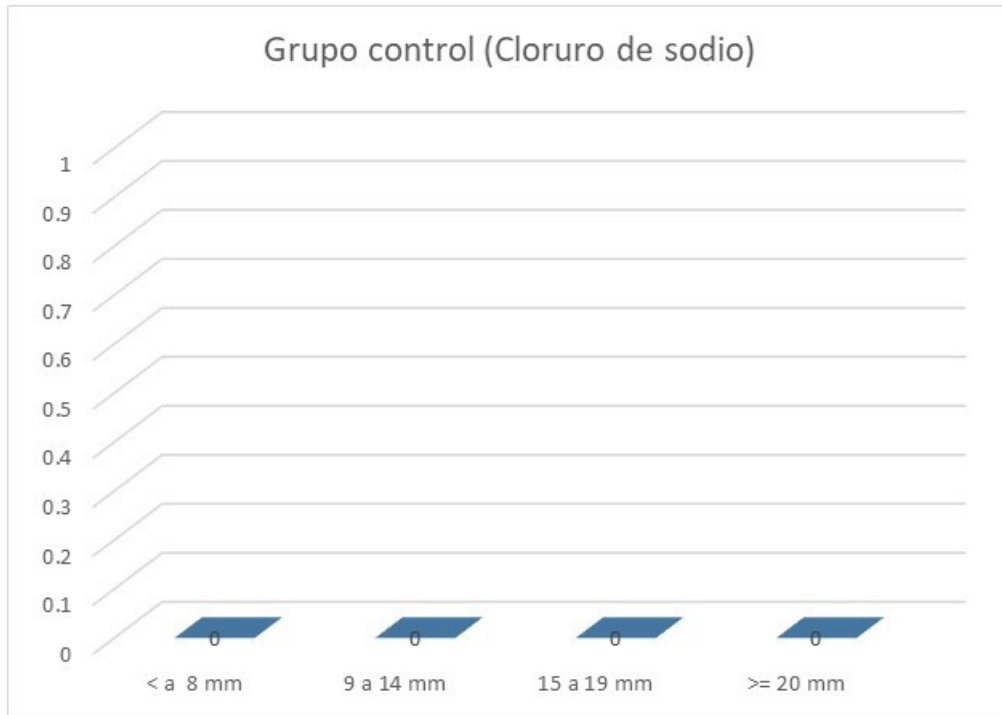
En la tabla N°4.1, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 70.8%(17) presenta una categoría de  $\geq 20$  mm, 16.7%(4) presenta una categoría de  $< 8$  mm, 12.5%(3) presenta una categoría de 15 a 19 mm 0,0%(0) presenta una categoría de 9 a 14 mm.

**Gráfico N°4.2. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 72 horas.**



En la tabla N°4.2, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 62.5%(15) presenta una categoría 15 a 19 mm ,20.8%(5) presenta una categoría 9 a 14 mm, 16.7%(4) presenta una categoría < a 8 mm.

**Gráfico N°4.3. Grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), observación a las 72 horas.**



En la tabla N°4.3, se observa el 100.00%(24) observaciones de la muestras de estudio, 0,00%(0) presenta todas las categorías.

## 2) Análisis bivariado

**Tabla N°5. Grupo de estudio experimental A mediciones: 24 horas, 48 horas y 72 horas (ESTUDIO IN VITRO).**

Mediciones		Inhibición en mm según Duraffourd				Total
		< 8 mm	9 a 14 mm	15 - 19 mm	>=20 mm	
24 horas	frecuencia	0	14	10	0	24
	%	0.0%	19.4%	13.9%	0.0%	33.3%
48 horas	frecuencia	0	4	13	7	24
	%	0.0%	5.6%	18.1%	9.7%	33.3%
72 horas	frecuencia	4	0	3	17	24
	%	5.6%	0.0%	4.2%	23.6%	33.3%
Total	frecuencia	4	18	26	24	72
	%	5.6%	25.0%	36.1%	33.3%	100.0%

**Fuente:** Guía de observación

En la tabla N°5, se observa el 100.00%(72) observaciones de la muestras de estudio, 23.6%(17) presenta categoría 72 horas, 19.4%(14) presenta categoría 24 horas, 18,1%(13) presenta categoría 48 horas, 13,9%(10) presenta categoría 24 horas, 5,6%(4) presenta categoría 72 horas y 4,2%(3) presenta categoría de 72 horas.

**Tabla N°6. Grupo de estudio experimental B mediciones: 24 horas, 48 horas y 72 horas (ESTUDIO IN VITRO).**

Mediciones		inhibición en mm según Duraffourd				Total
		< 8 mm	9 a 14 mm	15 - 19 mm	>=20 mm	
24 horas	frecuencia	0	24	0	0	24
	%	0.0%	33.3%	0.0%	0.0%	33.3%
48 horas	frecuencia	0	21	3	0	24
	%	0.0%	29.2%	4.2%	0.0%	33.3%
72 horas	frecuencia	4	5	15	0	24
	%	5.6%	6.9%	20.8%	0.0%	33.3%
Total	frecuencia	4	50	18	0	72
	%	5.6%	69.4%	25.0%	0.0%	100.0%

**Fuente:** Guía de observación

En la tabla N°6, se observa el 100.00%(72) observaciones de la muestras de estudio, 33,3%(24) presenta categoría de 24 horas, 29,2%(21) presentan categoría de 48 horas, 20,8%(15) presenta categoría de 72 horas, 5,6%(4) presenta categoría de 72 horas y 4,2%(3) presenta categoría de 48 horas.



**Tabla N°7. Grupo de estudio control las mediciones: 24 horas, 48 horas y 72 horas (ESTUDIO IN VITRO).**

Mediciones		inhibición en mm según Duraffourd				Total
		< 8 mm	9 a 14 mm	15 - 19 mm	>=20 mm	
24 horas	frecuencia	0	0	0	0	0
	%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
48 horas	frecuencia	0	0	0	0	0
	%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
72 horas	frecuencia	0	0	0	0	0
	%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
Total	frecuencia	0	0	0	0	0
	%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

**Fuente:** Guía de observación

En la tabla N°7, se observa el 100.00%(72) observaciones de la muestras de estudio, 0,00% presenta todas las categorías.

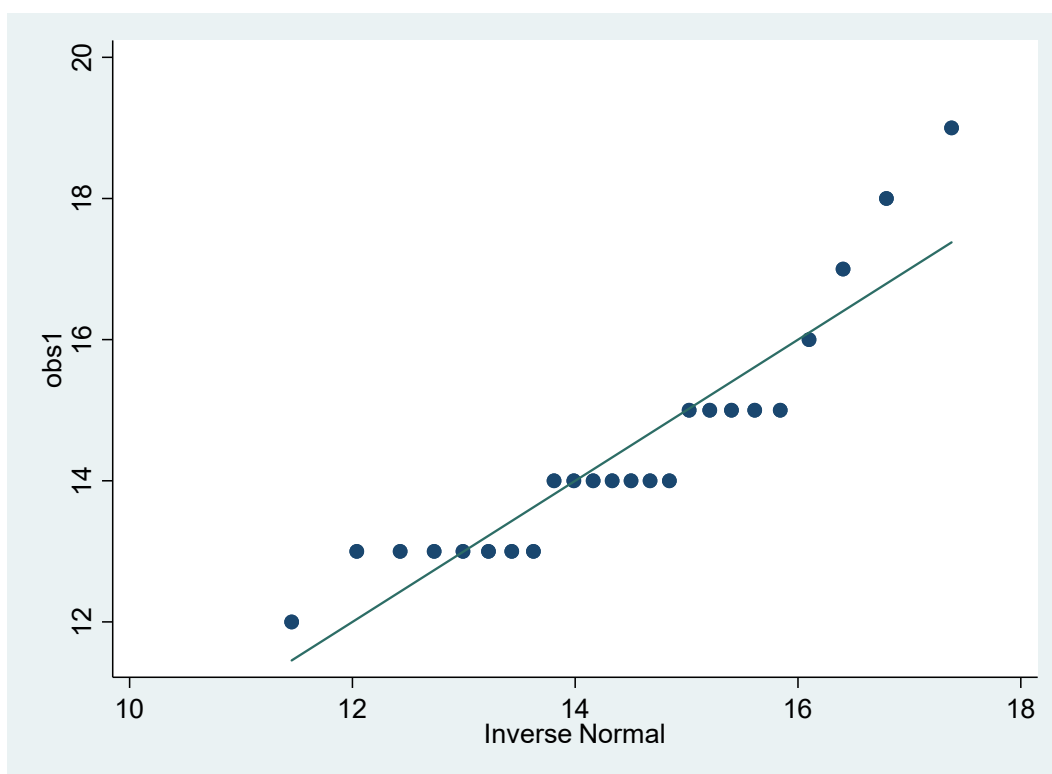
### 3) Prueba de normalidad

**Tabla N°8. Prueba de normalidad a las 24 horas (ESTUDIO IN VITRO).**

Grupo	D	P valor
obs1: 24 horas	0.2223	0.093
Cumulative:	-0.1595	0.295
Combined K-S:	0.2223	0.187

**Fuente:** Guía de observación

**Gráfico N°5. Prueba de normalidad a las 24 horas (ESTUDIO IN VITRO).**



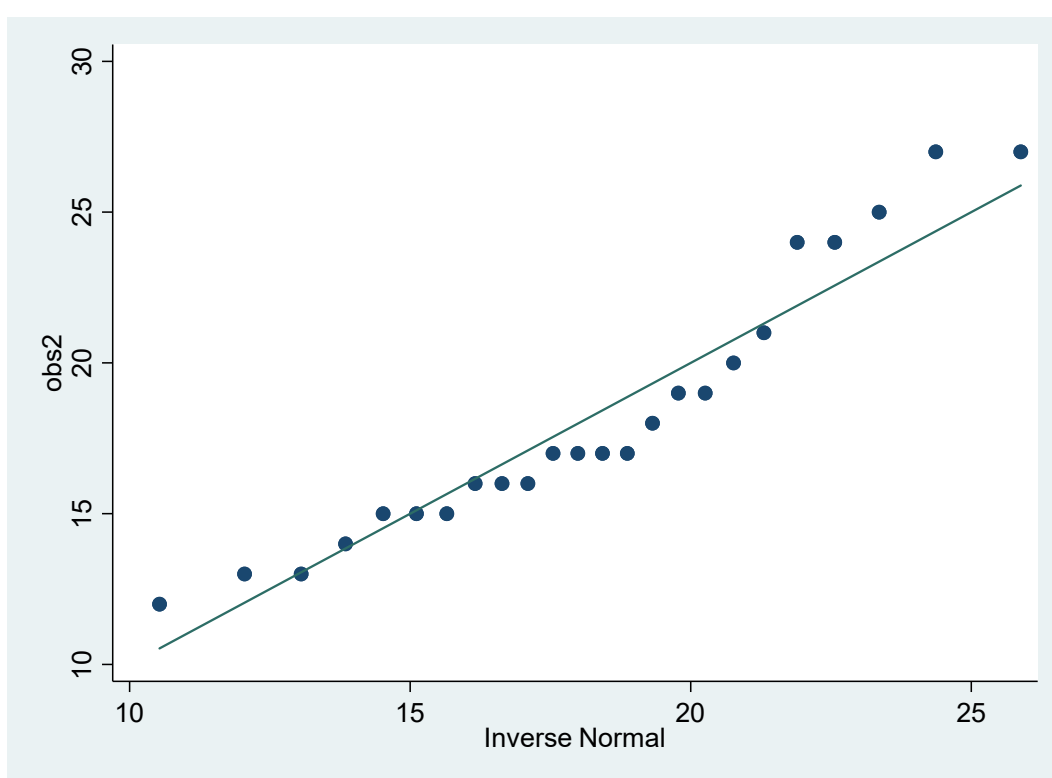
En la tabla N°8, se observa las variables de observación a las 24 horas presento un valor ( $p > 0.05$ ) por lo tanto verificando la  $H_0$ : Los datos provienen de una distribución normal

**Tabla N°9. Prueba de normalidad a las 48 horas (ESTUDIO IN VITRO).**

Grupo	D	P valor
obs2: 28 horas	0.1919	0.171
Cumulative:	-0.1151	0.529
Combined K-S:	0.1919	0.34

**Fuente:** Guía de observación

**Gráfico N°6. Prueba de normalidad a las 48 horas (ESTUDIO IN VITRO).**



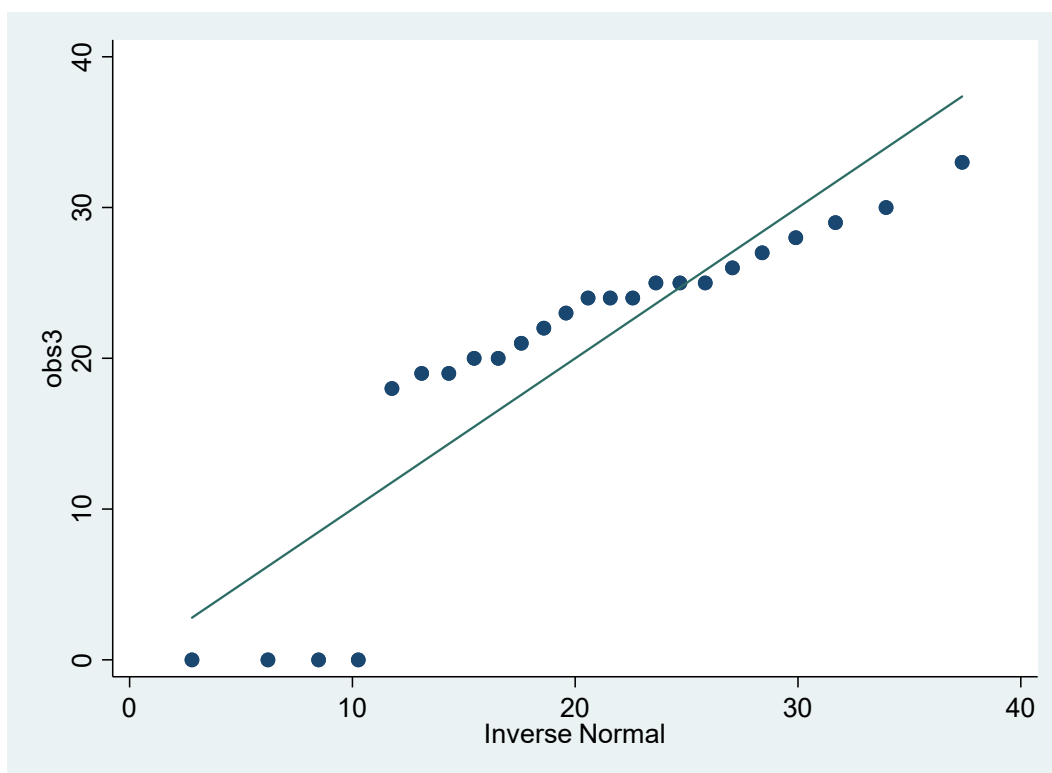
En la tabla N°9, se observa las variables de observación a las 48 horas presento un valor ( $p > 0.05$ ) por lo tanto verificando la  $H_0$ : Los datos provienen de una distribución normal

**Tabla N°10. Prueba de normalidad a las 72 horas (ESTUDIO IN VITRO).**

Grupo	D	P valor
obs3:72 horas	0.1457	0.361
Cumulative:	-0.2498	0.05
Combined K-S:	0.2498	0.100

**Fuente:** Guía de observación

**Gráfico N°7. Prueba de normalidad a las 72 horas (ESTUDIO IN VITRO).**



En la tabla N°10, se observa las variables de observación a las 72 horas presento un valor ( $p > 0.05$ ) por lo tanto verificando la  $H_0$ : Los datos provienen de una distribución normal

**4) Prueba de hipótesis, contraste de hipótesis o test de hipótesis. | 1223**

**Tabla N°11. Análisis de varianza, de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 24 horas.**

<b>Grupos de estudio - Observación "1" - 24 horas</b>					
	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
Entre grupos	2942.111	2	1471.056	1155.630	0.000
Dentro de grupos	87.833	69	1.273		
Total	3029.944	71			

**Fuente:** Guía de observación

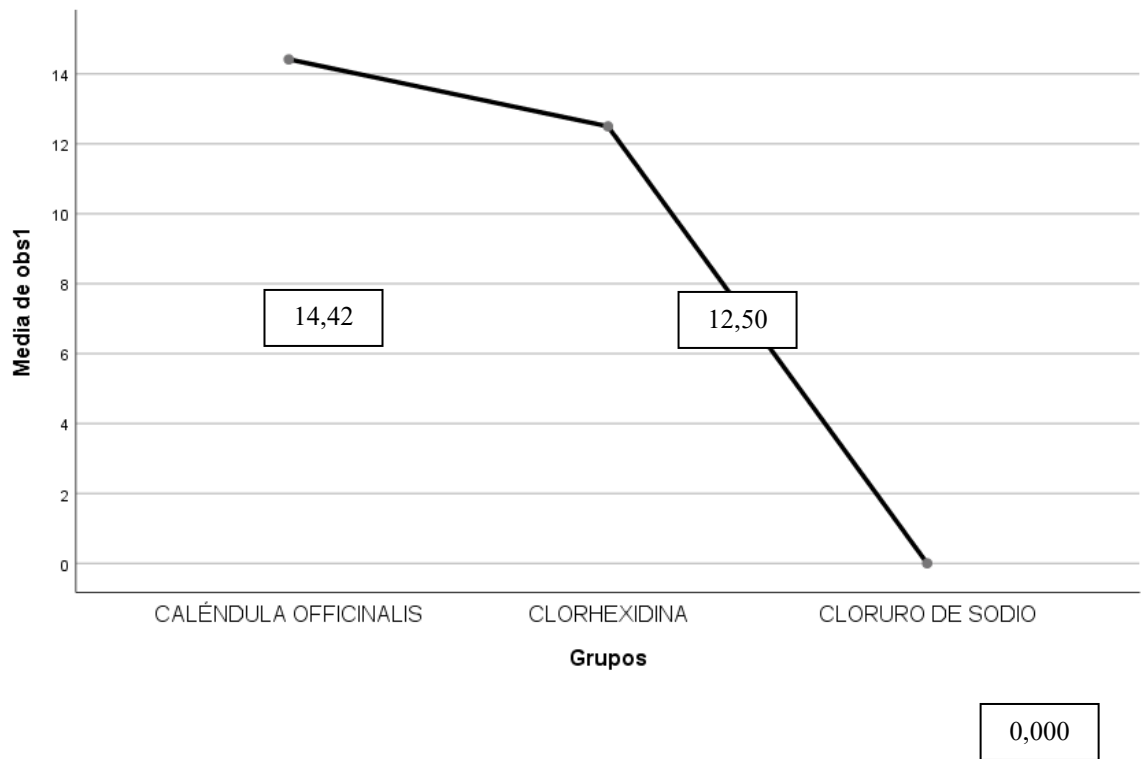
**Tabla N°12. Comparaciones múltiples (Bonferroni), de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 24 horas.**

<b>Comparaciones múltiples</b>						
<b>Bonferroni</b>						
					<b>Intervalo de confianza al 95%</b>	
		<b>Diferencia</b>			<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>
<b>(I) Grupos</b>		<b>de medias (I-J)</b>	<b>Desv. Error</b>	<b>P valor</b>		
<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	<b>COLORHEXIDINA</b>	1,917*	0.326	0.000	1.12	2.72
	<b>COLORURO DE SODIO</b>	14,417*	0.326	0.000	13.62	15.22
<b>COLORHEXIDINA</b>	<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	-1,917*	0.326	0.000	-2.72	-1.12
	<b>COLORURO DE SODIO</b>	12,500*	0.326	0.000	11.70	13.30
<b>COLORURO DE SODIO</b>	<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	-14,417*	0.326	0.000	-15.22	-13.62
	<b>COLORHEXIDINA</b>	-12,500*	0.326	0.000	-13.30	-11.70

**Fuente:** Guía de observación

En la tabla 11, se observa un p valor de 0,000 (<0,05), Por lo que con una probabilidad del 0,0%, existe diferencia entre los grupos. En conclusión: se contrasta la hipótesis nula y se verifica la hipótesis alterna Ha: Entre los grupos los promedios de dos grupos son diferentes a las 24 horas de observación.

**Gráfico N°8. Análisis de varianza, de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 24 horas.**



**Tabla N°13. Análisis de varianza, de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 48 horas.**

<b>Grupos de estudio - Observación "2" - 48 horas</b>					
	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>P valor</b>
<b>Entre grupos</b>	4242.583	2	2121.292	309.258	0.000
<b>Dentro de grupos</b>	473.292	69	6.859		
<b>Total</b>	4715.875	71			

**Fuente:** Guía de observación



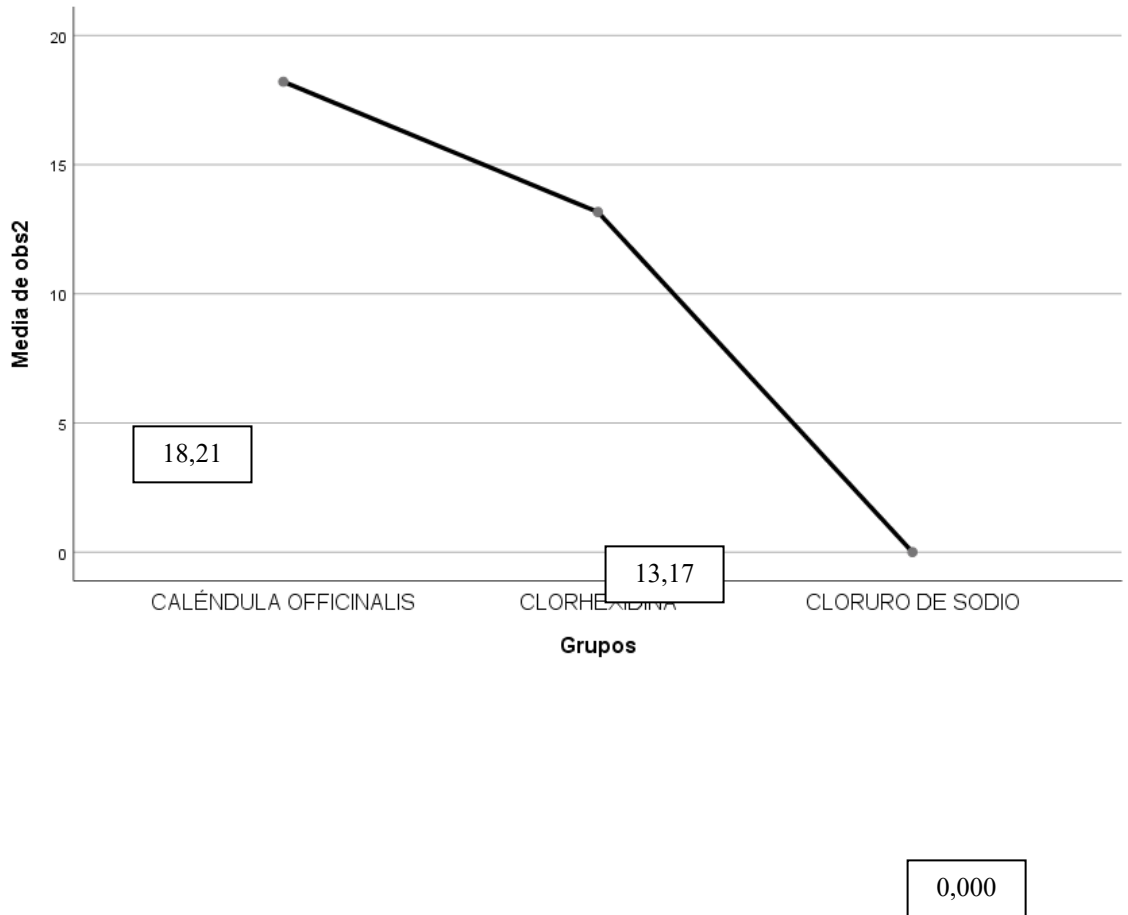
**Tabla N°14. Comparaciones múltiples (Bonferroni), de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 48 horas.**

		<b>Comparaciones múltiples</b>						
		<b>Bonferroni</b>						
		<b>Diferencia</b>			<b>Intervalo de</b>			
		<b>de medias</b>	<b>Desv.</b>	<b>P</b>	<b>confianza al 95%</b>			
<b>(I) Grupos</b>		<b>(I-J)</b>	<b>Error</b>	<b>valor</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>		
<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	<b>CLORHEXIDINA</b>	5,042*	0.756	0.000	3.19	6.90		
	<b>CLORURO DE SODIO</b>	18,208*	0.756	0.000	16.35	20.06		
<b>CLORHEXIDINA</b>	<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	-5,042*	0.756	0.000	-6.90	-3.19		
	<b>CLORURO DE SODIO</b>	13,167*	0.756	0.000	11.31	15.02		
<b>CLORURO DE SODIO</b>	<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	-18,208*	0.756	0.000	-20.06	-16.35		
	<b>CLORHEXIDINA</b>	-13,167*	0.756	0.000	-15.02	-11.31		

**Fuente:** Guía de observación

En la tabla 13, se observa un p valor de 0,000 ( $<0,05$ ), Por lo que con una probabilidad del 0,0%, existe diferencia entre los grupos. En conclusión: se contrasta la hipótesis nula y se verifica la hipótesis alterna  $H_a$ : Entre los grupos los promedios de dos grupos son diferentes a las 48 horas de observación.

**Gráfico N°9. Análisis de varianza, de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 48 horas.**



**Tabla N°15. Análisis de varianza, de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 72 horas.**

<b>Grupos de estudio - Observación "2" - 72 horas</b>					
	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>gl</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Sig.</b>
<b>Entre grupos</b>	4972.333	2	2486.167	55.308	0.000
<b>Dentro de grupos</b>	3101.667	69	44.952		
<b>Total</b>	8074.000	71			

**Fuente:** Guía de observación

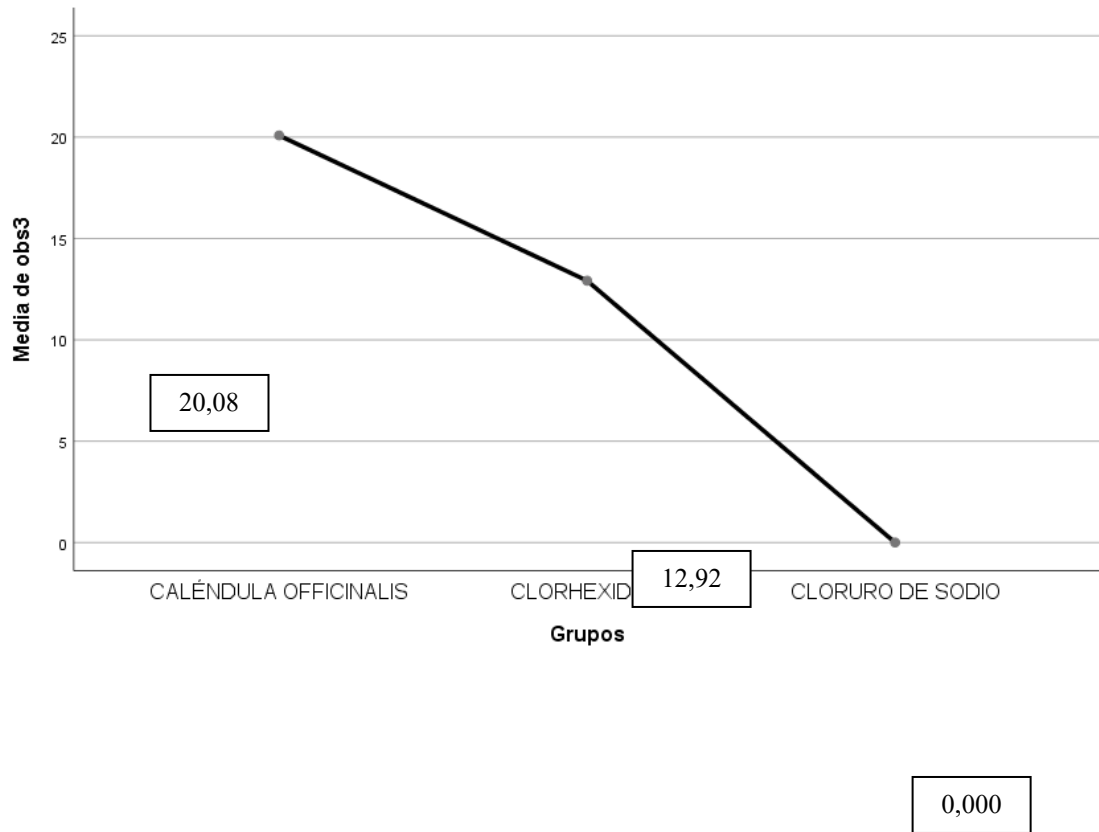
**Tabla N°16. Comparaciones múltiples (Bonferroni), de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 72 horas.**

		<b>Comparaciones múltiples Bonferroni</b>				
					<b>Intervalo de confianza al 95%</b>	
		<b>Diferenci a de</b>	<b>Desv. Erro</b>	<b>P valo</b>	<b>Límite inferio</b>	<b>Límite superio</b>
<b>(I) Grupos</b>	<b>J)</b>	<b>r</b>	<b>r</b>	<b>r</b>	<b>r</b>	<b>r</b>
<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	<b>CLORHEXIDIN A</b>	7,167*	1.935	0.00	2.42	11.92
	<b>CLORURO DE SODIO</b>	20,083*	1.935	0.00	15.33	24.83
<b>CLORHEXIDIN A</b>	<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	-7,167*	1.935	0.00	-11.92	-2.42
	<b>CLORURO DE SODIO</b>	12,917*	1.935	0.00	8.17	17.67
<b>CLORURO DE SODIO</b>	<b>CALÉNDULA OFFICINALIS</b>	-20,083*	1.935	0.00	-24.83	-15.33
	<b>CLORHEXIDIN A</b>	-12,917*	1.935	0.00	-17.67	-8.17

**Fuente:** Guía de observación

En la tabla 15, se observa un p valor de 0,000 (<0,05), Por lo que con una probabilidad del 0,0%, existe diferencia entre los grupos. En conclusión: se contrasta la hipótesis nula y se verifica la hipótesis alterna Ha: Entre los grupos los promedios de dos grupos son diferentes a las 72 horas de observación.

**Gráfico N°10. Análisis de varianza, de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 72 horas.**



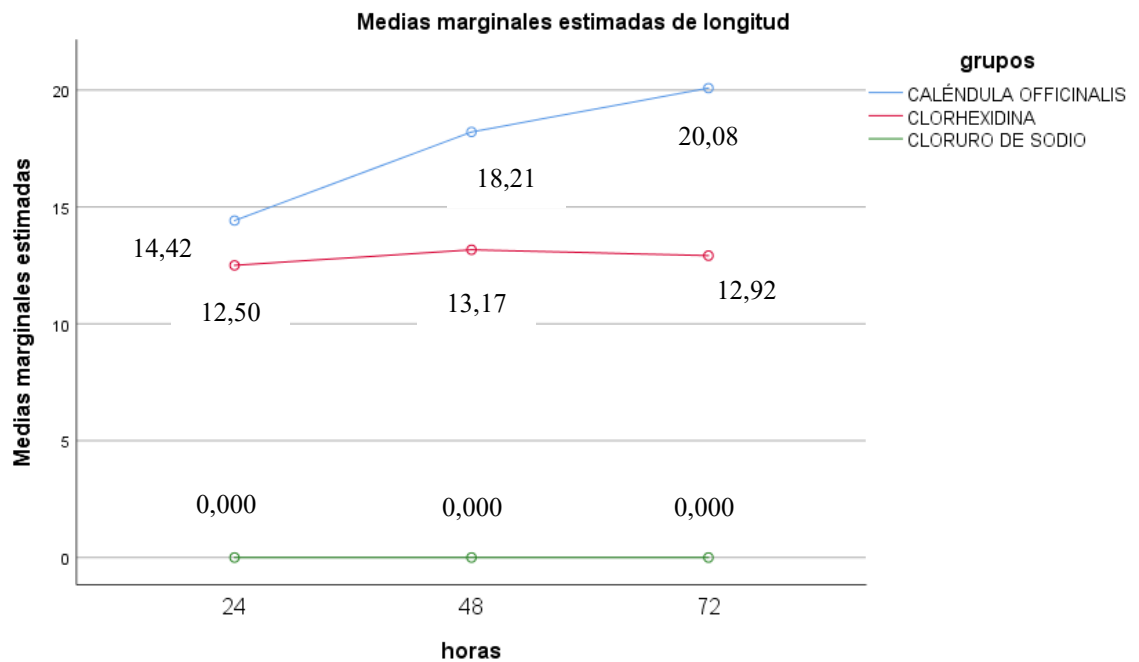
**Tabla N°17. Análisis de varianza relacionado (Pruebas de efectos inter-sujetos), de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 24,48 y 72 horas.**

<b>Pruebas de efectos inter-sujetos</b>						
<b>Tipo III</b>						
<b>de suma</b>						
<b>Origen</b>		<b>de</b>	<b>gl</b>	<b>Media</b>	<b>F</b>	<b>P valor</b>
		<b>cuadrados</b>		<b>cuadrática</b>		
<b>grupos</b>	<b>Hipótesis</b>	11910.287	2	5955.144	96.541	0.000
	<b>Error</b>	246.741	4	61,685 <sup>b</sup>		
<b>horas *</b>	<b>Hipótesis</b>	246.741	4	61.685	3.486	0.009
<b>grupos</b>	<b>Error</b>	3662.792	207	17,695 <sup>c</sup>		

**Fuente:** Guía de observación

**Gráfico N°11. Análisis de varianza relacionado (Pruebas de efectos inter-sujetos), de grupo de estudio experimental y control (ESTUDIO IN VITRO), a las 24,48 y 72 horas.**

En la tabla 17, se observa un p valor de 0,000 ( $<0,05$ ), Por lo que con una probabilidad del 0,0%, existe diferencia entre los grupos. En conclusión: se contrasta la hipótesis nula y se verifica la hipótesis alterna  $H_a$ : El aceite esencial de Caléndula Officinalis 15% posee mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina 0.12% frente a cepas de Porphyromona Gingivalis (estudio in Vitro).Lima-2019.



## CAPITULO V

### 5 DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* 15% sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis*, comparado con la clorhexidina al 0,12%. Para la prueba de sensibilidad bacteriana se utilizó la técnica de difusión en pozos, mediante 24 cultivos de *Porphyromonas Gingivalis* en placas Petri con agar Schaedler.

En nuestro estudio al realizar el análisis fitoquímico del extracto de la *Caléndula Officinalis* se reafirmó que dentro de sus componentes se encuentran los flavonoides, taninos, saponinas y estos serían quienes le confieren su acción antibacteriana. Resultado que coincide con la investigación **Manrique L.**<sup>10</sup> donde menciona que los constituyentes de la *Caléndula Officinalis* son los compuestos flavonoides, taninos, saponinas, ácidos fenólicos, sustancias peptídicas cuyos principios activos son de gran importancia en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Los resultados demostraron que el aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* 15% tiene un efecto inhibitorio más eficaz sobre cepas de *Porphyromonas Gingivalis*, en comparación con la clorhexidina 0,12% en tres mediciones horarias en el que se realizó la lectura, el diámetro del halo de inhibición a las 24 horas alcanzó un promedio de 14,42mm, a las 48 horas 18,21mm y a las 72 horas 20,08mm respectivamente. Resultados que difieren con la investigación de **Ayala D.**<sup>9</sup> donde el aceite esencial de *Caléndula Officinalis* (Margarita) obtuvo un efecto inhibitorio mínimo con un promedio de 5mm de halo de inhibición y ubicándose como un efecto nulo (-) frente a cepas de *Porphyromonas Gingivalis* ya sea porque en esta investigación no hace referencia a la concentración que fue empleada el aceite esencial de *Caléndula Officinalis*

De acuerdo a los resultados del efecto en los halos de inhibición bacteriana del aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* 15% sobre las cepas de *Porphyromona Gingivalis* podemos confirmar que tiene acción antibacteriana en bacterias gram negativas presentes en la enfermedad periodontal, hecho que coincide con el trabajo de



investigación de **Maji S.**<sup>8</sup> donde se demostró que la *Porphyromona Gingivalis*, *Prevotella Intermedia* y *Agregatibacter Acinomycetemcomitans*, bacterias gram negativas, fueron sensibles al extracto de *Caléndula. Officinalis*.

## CONCLUSIONES

- ✓ Al realizar la extracción del aceite esencial, se concluyó que el mejor método para la obtención es el mecanismo por arrastre de vapor - hidrodestilación, en el cual al principio, al desecar la inflorescencia de las plantas se consigue una mayor concentración de sus sustancias y se impide que las mismas se volatilicen.
- ✓ Se comprobó una diferencia importante entre los tres grupos de estudio dando como resultado una mayor inhibición bacteriana del aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15% con un valor promedio a las 24 horas de 14,42mm a las 48 horas de 18,21mm y a las 72 horas de 20,08mm mientras que la clorhexidina 0,12% dio como valor promedio a las 24 horas de 12,50mm a las 48 horas de 13,17mm y a las 72 horas de 12,92mm respectivamente.
- ✓ Cabe resaltar que para la presente investigación utilizamos como control negativo suero fisiológico 5ml, la cual no formó halo inhibitorio en ninguno de los ensayos, manteniéndose en 0 mm lo cual nos sirvió a manera de control de calidad garantizando la siembra bacteriana y que la formación de los halos inhibitorios alrededor de los pocillos con las diferentes sustancias fueron formados a efecto de estas.

## SUGERENCIAS Y RECOMENDACIONES

### A la Universidad Nacional Hermilio Valdizán

- ✓ Implementar laboratorios y reforzar investigaciones de este tipo en la EP de Odontología ya que existe un gran potencial en nuestra medicina tradicional.

### Al área de investigación de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán

- ✓ Realizar estudios de la *Caléndula Officinalis*, tomando muestras de las diferentes regiones del Perú.

### A la EP. De Odontología

- ✓ Determinar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* 15% frente a otros microorganismos presentes en el biofilm
- ✓ Generar cultivos de *Porphyromonas Gingivalis* aislado de pacientes de nuestro medio para ser cultivadas y sembradas de la misma manera que en el presente estudio, para después ser sometidas a las sustancias utilizadas y evaluar los resultados.
- ✓ Realizar estudios para determinar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) del aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* 15%
- ✓ Se recomienda hacer un estudio de citotoxicidad y biocompatibilidad de la *Caléndula Officinalis* para ser utilizados en seres humanos.
- ✓ Realizar estudios con diferentes concentraciones del aceite esencial de la *Caléndula Officinalis* para verificar su acción en otras proporciones..
- ✓ Implementar tratamientos fitoterapéuticos que se encuentren al alcance de la sociedad

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Minsa [Internet]. Perú. 2014 [fecha de acceso 10 de febrero del 2014]. Disponible en: [https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion\\_2.asp?sub5=13](https://www.minsa.gob.pe/portalweb/06prevencion/prevencion_2.asp?sub5=13)
2. Ardila M. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. Rev Scielo [internet]. 2010 [citado 22 Marzo 2019]; 22(1):27-35. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1699-65852010000100004](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1699-65852010000100004)
3. Ramos PD, Moromi NH, Martinez CE. Porphyromonas gingivalis: patógeno relevante en la periodontitis crónica. Odontol Sanmarquina. 2011; 14(1): 34-38.
4. Humberto LV, Rosario PG. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos Calendula officinalis. Rev Cubana Farm [internet]. 1999 [citado 22 Marzo 2019]; 33(3). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S00347515199900030007](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00347515199900030007)
5. Angélica HC, Yolanda BA, María MP, Jorge LM. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales Bacterial related to periodontal diseases Facultad de Odontología Mexicali Universidad Autónoma de Baja California <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>
6. Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide ride extract from Porphyromona gingivalis. Infect Immun. 1999; 67(6): 2841-2846.
7. Parra RC. Efecto inhibitorio de Extracto de Calendula Officinalis vs Clorhexidina al 2% sobre cepas de Staphylococcus Aureus [Internet] Quito: Universidad Central de Ecuador; 2017 [Acceso 2018 Oct 02] Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/12793>
8. Maji S, Gururaj S, Jyotirmayee R, Chethana, Bhushan K, Kumar S. Efficacy of Calendula officinalis Extract (Marigold Flower) as an Antimicrobial Agent against Oral Microbes: An Invitro Study in Comparison with Chlorhexidine Digluconate. Journal of Clinical and Diagnostic Research [Internet] 2017; 11:

- 5-10 [Acceso 2018 Nov 04] Disponible en:  
[https://www.jcdr.net/articles/PDF/10702/29844\\_CE\(RA1\)\\_F\(AP\)\\_PF1\(VSU\\_GG\)\\_PFA\(VJ\\_SS\).pdf](https://www.jcdr.net/articles/PDF/10702/29844_CE(RA1)_F(AP)_PF1(VSU_GG)_PFA(VJ_SS).pdf).
9. Ayala DC. Efecto antibacteriano del aceite esencial de Margarita (*Calendula Officinalis*) y Jengibre (*Zingiber Officinale*) vs. Clorhexidina al 2% sobre cepas de *Porphyromona Gingivalis*: estudio in vitro [Revista en Internet] Quito: Universidad Central de Ecuador; 2016 [Acceso 2018 Oct 02] Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/8253>
  10. Manrique LK. Efectividad antimicrobiana de la Clorhexidina y la Caléndula *Officinalis* en las suturas de seda negra 3/0 pos exodoncia [Internet] Lima: Universidad De San Martin De Porras; 2016 [Acceso 2018 Oct 10] Disponible en:  
[http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/usmp/2732/1/manrique\\_clk.pdf](http://www.repositorioacademico.usmp.edu.pe/bitstream/usmp/2732/1/manrique_clk.pdf)
  11. Montenegro A, Ramos D. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia Spinosa* (tara) sobre *Porphyromonas Gingivalis*. *Odontol. Sanmarquina* [Revista en Internet] 2016; 19: 7-11 [Acceso 2018 Nov 12] Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/12175>
  12. Garcia KR. Efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia Sinensis* (té verde) usada como colutorio, sobre placa bacteriana y saliva. [Internet] Trujillo: Universidad Nacional De Trujillo; 2015 [Acceso 2018 Dic 04] Disponible en:  
<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/2047/Tesis%20Doctorado%20-%20Garc%C3%ADa%20Padilla%20Kathya.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  13. Recinez SD. Eficacia antibacteriana in vitro del extracto de la *Caesalpinia Spinosa* “tara” en comparación con la Clindamicina frente a la *Porphyromona Gingivalis*. Hospital Materno Infantil Carlos Showing Ferrari, Huánuco 2017 [Internet] Huánuco: Universidad Nacional Hermilio Valdizán; 2018 [Acceso 2018 Nov 21] Disponible en:  
<http://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/UNHEVAL/3148/TO%2000092%20R33.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

14. Belsuzarry CD, Valderrama DW. Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de Pelargonium X Hortorum L.H. Bailey sobre cepas de Porphyromonas Gingivalis. [Internet] Huánuco: Universidad Nacional Hermilio Valdizán; 2015 [Acceso 2018 Nov 21] Disponible en: <http://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/UNHEVAL/723/TO%200040%20B38.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
15. Espejo BJ, Ruiz GM. Efecto antibacteriano del extracto etanolico del Piper Aduncum (matico) frente a cepas de Porphyromonas Gingivalis. Estudio in vitro. Lima 2014 [Internet] Huánuco: Universidad Nacional Hermilio Valdizán; 2015 [Acceso 2018 Nov 21] Disponible en: <http://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/UNHEVAL/721/TO%200038%20E85.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Castillo PAM, Liébana UJ, Andrés GMT. Bacterias anaerobias estrictas de interés oral (II). anaerobios no esporulados. En: Liébana JU. Microbiología Oral. Madrid: Interamericana: MCGRAW-HILL; 2002.
17. Newman, M., Carranza, F., Takei, H., & Klokkevold, P. *Clinical Periodontology* In Saunders Elsevier: *Carranza's*; 2006.
18. Magee JT, Hindmarch JM, Duerden BI, Goodwin L. Classification of oral pigmented anaerobic bacilli by pyrolysis mass spectrometry and biochemical test. J. Med. Microbiol. 1992.
19. Olsen I, Shah HN, Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. Periodontol. Vol 1. 20a ed. 2000. 1999.
20. Ramos Perfecto D, Mororni Nakata H, Martínez Cadillo E, Porphyromonas Gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. Odontol. Sanmarquina 2011; 14(1): 34-38.
21. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the Gum line: Pathogenic Mechanisms of Porphyromona gingivalis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62(4): 1244-1263.
22. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors in Porphyromonas Gingivalis. Periodontol 2000. 1999; 20 : 168-238.
23. Pathirana RD, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Host immune responses to Porphyromonas gingivalis antigens. Periodontol 2000. 2010; 52: 218-237.

24. N, Collyer C, Gingipains From Porphyromonas Gingivalis - Complex Domain Structures Confer Diverse Functions. *European Journal of Microbiology and Immunology*.2011; 2011 (1): 41-58.
25. Holt SC, Ebersole JL. Porphyromona gingivalis, Treponema denticola, Tannerella forsythia : the “Red Complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2005; 38:135–187.
26. Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiology*. 2010; 10(5): 1-11.
27. Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide ride extract from Porphyromona gingivalis. *Infect Immun*. 1999; 67(6): 2841-2846.
28. Schaedler, R.W., R. Dubos, and R. Costello. 1965. The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J. Exp. Med*. 122:59-66.
29. Kustner, E. C. Antisépticos en medicina bucal: la clorhexidina. *JANO*, 2003; 35-38.
30. Torres López, M., Diaz Alvarez, M., & Acosta Morales, A.. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la estomatología. *Gaceta Médica Espirituana*. 2009; 11(1):1-5.
31. Morante S; Valoración cruzada y a doble ciego, Mediante el modelo de gingivitis Experimental, de la eficacia de tres Colutorios de clorhexidina sin alcohol Frente a la prevención de gingivitis y a la Neoformación de placa supragingival. Memoria presentada para optar al grado de doctor, Universidad Complútense de Madrid, 2003.
32. Acosta, L. Rodriguez, C. Sanchez, E. “Instructivo técnico de Caléndula Officinalis”.Cubana. *Plant. Med*. 2001; 25(1):23 – 27.
33. Thompson W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1ª ed. Barcelona. Blume; 1981.
34. Lastra, V. Piquet, R. “Artículos de Revisión Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos: Caléndula Officinalis”; *Rev. Cubana Farm*. 1999; 22(1):188-194.
35. Centeno, L. Plantas medicinales españolas Calendula officinalis L.(Asteraceae). *Medicina Naturista*. 2004;5(1): 257–261.

36. Águila, B. Menendez, R. Gonzalez, C. Fernández, D. “Extracto Acuoso de Caléndula. Estudio Preliminar de sus propiedades”. Universidad Central del Ecuador; 2000; págs. 30 – 31.
37. Acosta, L.; “Instructivo técnica de caléndula”; Cubana Plan Med; 2001; 23 – 27.
38. Muley, B., Khadabadi, S., & Banarase, N. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*.2009; 8:455–465.
39. Cechinel Filho, V., & Yunes, R. a. (1998). Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21(11):99– 105.
40. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). European Union herbal monograph on *Calendula officinalis* L., flos. Editors, and publishers [ internet ] 2017 [Actualizado 27 de marzo del 2018; citado 12 mayo 2019].Disponible en: <http://www.emea.europa.eu>
41. Fang L. Herrera,A. Díaz A.“Enjuagues de Caléndula officinalis como alternativa de los antisépticos orales”; *Rev Cubana de Estomatología*; 2013: 436-442.
42. Palacios, M. “Las tinturas madre homeopáticas de *Caléndula officinalis* y *Echinacea angustifolia* como antiséptico oral”; *Rev. Med Homeopat*; 2013:112- 126.
43. Ukiya M., Akihisa T., Yasukawa K., Tokuda H., Suzuki T., & Kimura Y. Anti-inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *Journal of Natural Products*. 2006 ; 69: 1692–1696.
44. Zitterl-Eglseer K., Sosa S., Jurenitsch J., Schubert-Zsilavec M., Della Loggia R., Tubaro A. Franz C. Anti-oedematous activities of the main triterpenoid esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Ethnopharmacology*.1997; 57: 139–44.
45. Parente LM, Lino RD, Tresvenzol, LM, Vinaud MC, De Paula JR. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. Brazil: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine; 2012.



46. Kalvatchev, Z., Walder, R., & Garzaro, D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula* flowers. *Biomed and Pharmacotherapy*, 1997; 51: 176–180.
47. Efstratiou E., Hussain A, Nigam P, Moore J, Ayub M. a, & Rao, J. R. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2012;18: 173–6.
48. Gazim ZC., Rezende CM., Fraga SR., Inez, T., Svidzinski, E., Aparicio, D., & Cortez, G. . Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteraceae) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2012;39: 61–63.
49. Varljen J., Lipták A., & Wagner H. Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan and arabinogalactans with immuno-stimulating activity from *Calendula officinalis*. *Phytochemistry*, 1989; 28: 2379–2383.
50. Amirghofran, Z., Azadbakht, M., & Karimi, M. Evaluation of the immunomodulatory effects of five herbal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002;72: 167–172.
51. Supo J. Seminarios de Investigación Científica: Metodología de la investigación para las ciencias de la salud. Arequipa (Oct 12, 2012)
52. Duraffourd,C., & Lapraz, J. (2002). *Traite de phytotherapie clinique*. Paris: Masson.

## **ANEXOS**

FACTOR	ACCION
Fibrinas	Estimula la producción de IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-12, factor de necrosis tumoral $\alpha$ y proteínas inflamatorias y quimiotácticas de monocitos.
Lipopolisacáridos	Modula de formación de colágeno y la proliferación de fibroplastos. Estimula la producción de IL-1, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13. Factor de necrosis tumoral $\alpha$ y proteínas inflamatorias y quimiotácticas de monocitos. Induce a producción de factor de necrosis tumoral $\alpha$ , PGE <sub>2</sub> y la activación del complemento.
Proteínas de la membrana externa: De 24 kDa (Omp24) De 75 kDa	Reabsorción ósea. Estimula la secreción de IL-1 $\alpha$ .
Vesículas	Hidrolizan caseína, colágeno, cromogénico- arginina y glicilprolina.
<p>Proteinasas Gingipainas</p> <p>Colagenasa, proteasa relacionada con la estreptopaina y Peptidasa Pz</p> <p>Proteínasa tripsina de 80 kDa</p> <p>Proteínasa tiol de 140 kDa</p> <p>Proteínasa dipeptil aminopeptidasa IV</p> <p>Proteína de 35 kDa</p> <p>Proteínasa cisteína de 75 kDa (periodontina)</p>	<p>Degrada laminina y fibronectina. Hidrolisis del colágeno tipo I, III, IV y V Degrada fibrinógeno. Inactiva los inhibidores de las proteinasas (<math>\alpha</math>-antitriptina y <math>\alpha_2</math>-macroglubulina). Activa las metaloproteinasas de la matriz. Activa la cascada clicaireina/ quinina Lis-gingipaina degrada las uniones de las células epiteliales.</p> <p>Degrada colágeno.</p> <p>Estimula la producción de MMP-8 en los PMN y MMP-1 en los fibroblastos gingivales.</p> <p>Activa MMP-1 y MMP-3 en los fibroblastos gingivales.</p> <p>Activa MMP-1.</p> <p>Induce la secreción de MMP-1 y factor activador del plasminógeno en fibroblastos gingivales.</p> <p>Inactiva al inhibidor de la proteinasas x, produciéndose la liberación de altos niveles clínicos de elastasa.</p>

**Cuadro 01.** Factores de virulencia de Porphyromona Gingivalis relacionados con la destrucción del tejido del huésped. Fuente:( Iniesta, Herrera, Serrano & Sanz, 2008)

<b>TIPO DE ENSAYO</b>	<b>RESULTADOS</b>
Descripción	<b>Líquido ámbar oscuro de olor a flores</b>
Sólidos totales (%)	<b>3,495</b>
pH	<b>5,4</b>
Saponinas	<b>Presenta</b>
Polisacáridos	<b>Presenta</b>
Flavonoides	<b>Presenta</b>
Aminoácidos	<b>Presenta</b>
Taninos	<b>Presenta</b>

**Cuadro 02:** Determinaciones analíticas del extracto acuoso de *Caléndula Officinalis*;  
Águila



**Figura 01.** *Caléndula Officinalis* en su forma silvestre **Fuente:** Autoras



**Figura 02:** *C. Officinalis* from *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*,  
by Thomé, 1885

**IDENTIFICACION DE PLANTA EN EL MUSEO  
DE HISTORIA NATURAL DE LA U.N. M. S. M.**

# ANEXO N°01 Constancia de muestra vegetal del Museo de Historia Natural –Herbario San Marcos- USM

  **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL** 

“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”

**CONSTANCIA N° 329 -USM-2019**

LA JEFE (e ) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Mayra Alejandra Delgado Trujillo y Deissy Sthefany Ramos Ato**, estudiantes de la Universidad Nacional Hermilio Valdizan – Huánuco, ha sido estudiada y clasificada como: ***Calendula officinalis* L.** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: ASTERALES**

**FAMILIA: ASTERACEAE**

**GENERO: *Calendula***

**ESPECIE: *Calendula officinalis* L.**

Nombre vulgar: “Caléndula”  
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere conveniente.

Lima, 21 de octubre de 2019

   
**Dra. Monica Arakaki Makishi**  
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ ddb

Av. Arenales 1256, Jesús María  
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono: 619-7000 anexo 5703

E-mail: [museo@unmsm.edu.pe](mailto:museo@unmsm.edu.pe)  
<http://museo@unmsm.edu.pe>

**OBTENCION DE ACEITE ESENCIAL DE  
CALENDULA OFFICINALIS 15% Y MARCHA  
FITOQUIMICA**



**SECUENCIA DE ELABORACION DEL PROYECTO**  
**ACEITE ESENCIAL DE *CALENDULA OFFICINALIS* 15%**



**Figura 03.** *Caléndula Officinalis* sitio de recolección. **Fuente** Autoras



**Figura 04.** Acondicionamiento de *Caléndula Officinalis* para ser trasladada a la ciudad de Lima. **Fuente** Autoras



**Figura 05** .Limpieza y separación de las partes de *Caléndula Officinalis*.

**Fuente** Autoras



**Figura 06**. Pesado y desecación de la flor de *Caléndula Officinalis*.

**Fuente** Autoras

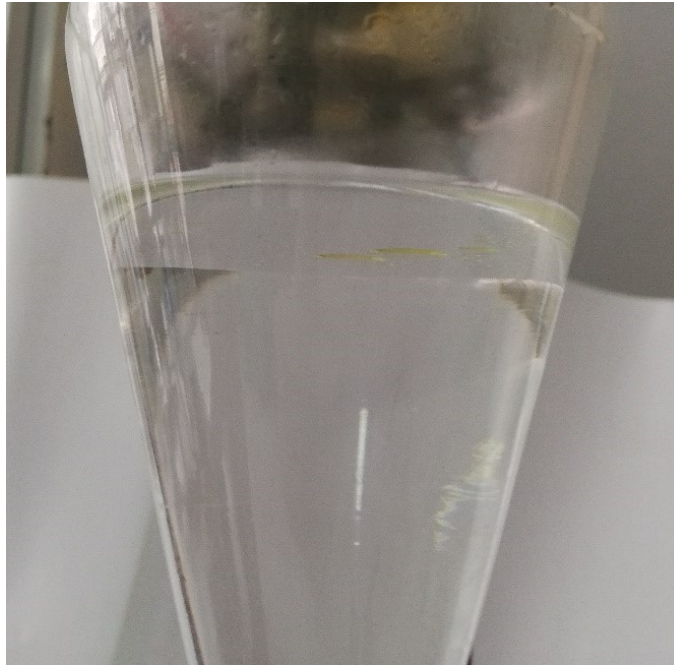


**Figura 07.**Preparacion de la mezcla de Caléndula Officinalis. **Fuente** Autoras



**Figura 08.** Sistema de Arrastre de Vapor – Hidrodestilación Proceso de ebullición.

**Fuente** Autoras



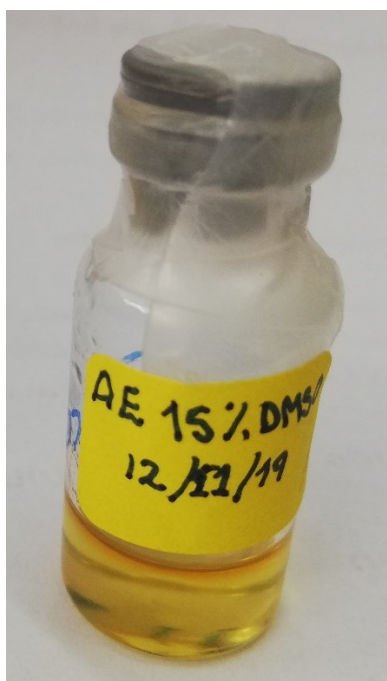
**Figura 09.** Separación del agua destilada y el aceite. **Fuente** Autoras



**Figura 10.** Eliminación de agua destilada (decantación). **Fuente** Autoras



**Figura 11.** Colocación de *Sulfato de Sodio Anhidrido*. **Fuente** Autoras



**Figura 12.** Aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15% DMSO. **Fuente** Autoras

## ANEXO N° 02 Marcha fitoquímica realizada en el Laboratorio de Anatomía y Farmacognosia vegetal de la UNMSM



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE ANATOMIA Y FARMACOGNOSIA VEGETAL**

**INFORME DE ENSAYO N° DI001-1219**

### MARCHA FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Reacciones de identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto problema con reactivos específicos por métodos colorimétricos y de precipitación (Domínguez, 1985; Lock, 1994)

Muestra: Extracto hidroalcohólico de inflorescencias de Caléndula.

Concentración utilizada: 50-100 mg del extracto problema disuelto en agua y alcohol. Para los ensayos 11 y 12 se utilizó 500 mg disueltos en cloroformo.

TIPO DE REACCIÓN / PRUEBA	METABOLITO	RESULTADO
01. Gelatina-sal	Taninos	+
02. Tricloruro Férrico	Taninos-Compuestos fenólicos	+
03. Shinoda	Flavonoides	+
04. Molish	Glicósidos	+
05. Antrona	Glicósidos	+
06. Bortranger	Quinonas	-
07. Fehling A y B	Azúcares reductores	+
08. Dragendorff	Alcaloides	+/-
09. Mayer	Alcaloides	-
10. Wagner	Alcaloides	-
11. Liebermann – Burchard	Terpenoides/Esteroides	+/-
12. Salkowski	Terpenoides/Esteroides	-
13. Ninhidrina	Aminas - Aminoácidos Libres	-
14. Seliwanoff	Grupo cetónico	+
15. Biuret	Proteínas	-
16. Ácido nítrico-hidróxido	Proteínas	+/-
17. Millon	Proteínas	-
18. Espuma	Saponinas	+

Leyenda: (+) presencia del metabolito (+/-) poco evidente o dudoso (-) no detectable en el ensayo

IE-DI001-1219 [1 de 2]



**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)


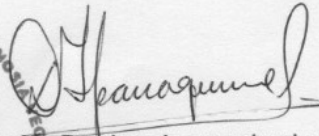


**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE ANATOMIA Y FARMACOGNOSIA VEGETAL**

La muestra correspondiente al extracto hidroalcohólico de Caléndula presenta compuestos fenólicos, flavonoides, taninos condensados o catéquicos, glicósidos, azúcares reductores, cetosas, saponinas y terpenoides en trazas ; bajo las condiciones de las pruebas no se evidencia alcaloides, quinonas, esteroides, aminas o aminoácidos libres.

Lima, 17 de diciembre de 2019

  
Analista: Mg Domingo Iparraguirre León  
  
Domingo Iparraguirre León  
Biólogo  
CBP.2219

IE-DI001-1219 [2 de 2]

**ANEXO N° 03 Constancia de obtención de aceite esencial de la inflorescencia de la planta denominada *Caléndula Officinalis* 15% en el Laboratorio de Anatomía y Farmacognosia vegetal de la UNMSM**

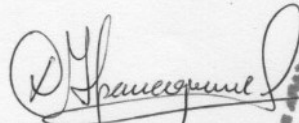
**CONSTANCIA**

A quien corresponda:

El suscrito, Domingo Iparraguirre León, Jefe del Laboratorio de Anatomía y Farmacognosia Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, informa que las señoritas bachilleres DELGADO TRUJILLO, MAYRA ALEJANDRA y RAMOS ATO, DEISSY STHEFANY de la Facultad de Medicina Humana, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán-Huánuco, han desarrollado en nuestro laboratorio la técnica de hidrodestilación para obtener los aceites esenciales de la inflorescencias de la planta denominada Caléndula, en el laboratorio de Anatomía y Farmacognosia Vegetal, para el desarrollo de su proyecto de Tesis "Efecto antibacteriano entre el aceite esencial de *Calendula officinalis* 15 % y la clorhexidina 0,12 % frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* (estudio in vitro). Lima 2019", realizando todo el procesamiento durante el mes de noviembre de 2019.

Se expide la presente a las interesadas para los fines que estimen conveniente.

Lima, 29 de noviembre de 2019



**Mg. Domingo Iparraguirre León**

Profesor Principal - Departamento Académico de Botánica  
Laboratorio de Anatomía y Farmacognosia Vegetal  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos





**OBTENCION DE LAS CEPAS DE  
PORPHYROMONAS GINGIVALIS,  
FLUJOGRAMA Y PRUEBA DE EFECTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA (IN VITRO)**

# ANEXO N°04 Certificado de Calidad de Cepas de Porphyromonas Gingivalis ATCC 33277

thermo**scientific**

## Certificate of Quality

**Product Name:** P. gingivalis ATCC 33277 PK/5  
**Lot Number:** 522909

**Product Number:** R4609008  
**Expiration Date:** 2020-11-04  
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Inc., a part of Thermo Fisher Scientific Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

### Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

### Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

### Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description.  
Traditional staining is performed.

### Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Negative Rod

Biochemical Profile: Remel RapID ANA II

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

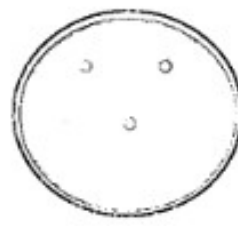
Signed



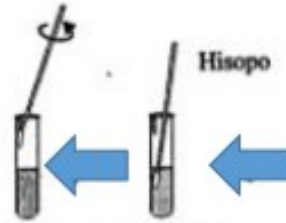
Quality Assurance Supervisor

## 2) PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

1) /



Elaboración de los pocillos.



TOMA DEL INÓCULO



Siembra por  
diseminación de la  
*Porphyromonas*  
*Gingivalis*

Aceite esencial de *Caléndula*  
*Officinalis* 15%

Suero fisiológico 5ml.

Clorhexidina 0.12%

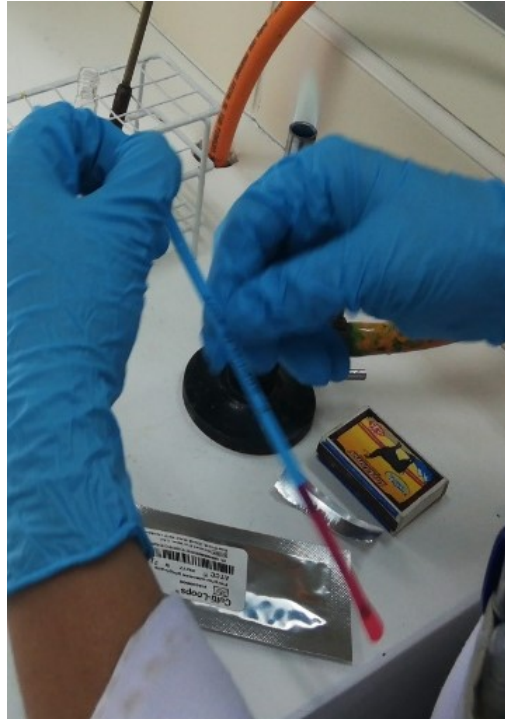
Aplicaron en cada  
pocillo las soluciones  
correspondientes.

Medición del diámetro de los halos de inhibición de  
crecimiento bacteriano.

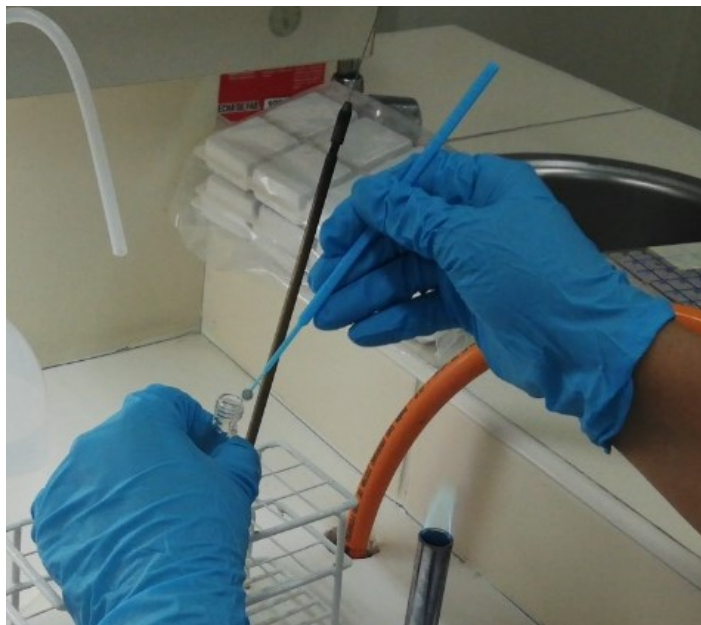


FLUJOGRAMA

**REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE *P. GINGIVALIS* ATCC®**  
**33277™**



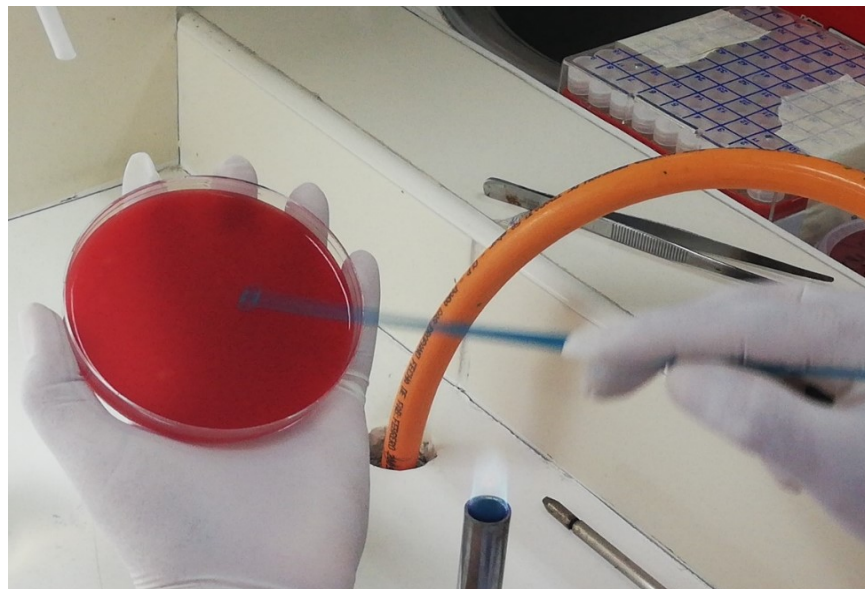
**Figura 13.** Se abrió el vial de acuerdo a las instrucciones adjuntas. **Fuente Autoras.**



**Figura14.** Colocación de la cepa en el caldo de Tripticasa Soya. **Fuente Autoras.**



**Figura 15.** Utilizamos el Vortex para homogenizar la Cepa de *P. Gingivalis* ATCC® 33277™ **Fuente Autoras.**



**Figura 16.** Siembra por aislamiento de *P. Gingivalis* ATCC® 33277™. **Fuente Autoras.**



**Figura 17.** Jarra de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis contenido las placas Petri con el cultivo de *P. Gingivalis*. **Fuente** Autoras.



**Figura 18.** Características morfológicas de las colonias de *Porphyromonas Gingivalis*. **Fuente** Autoras.

### **CULTIVO DE LA CEPA DE P. GINGIVALIS**



**Figura 19.** Asa de siembra estéril se tomó colonias de *Porphyromona Gingivalis*.

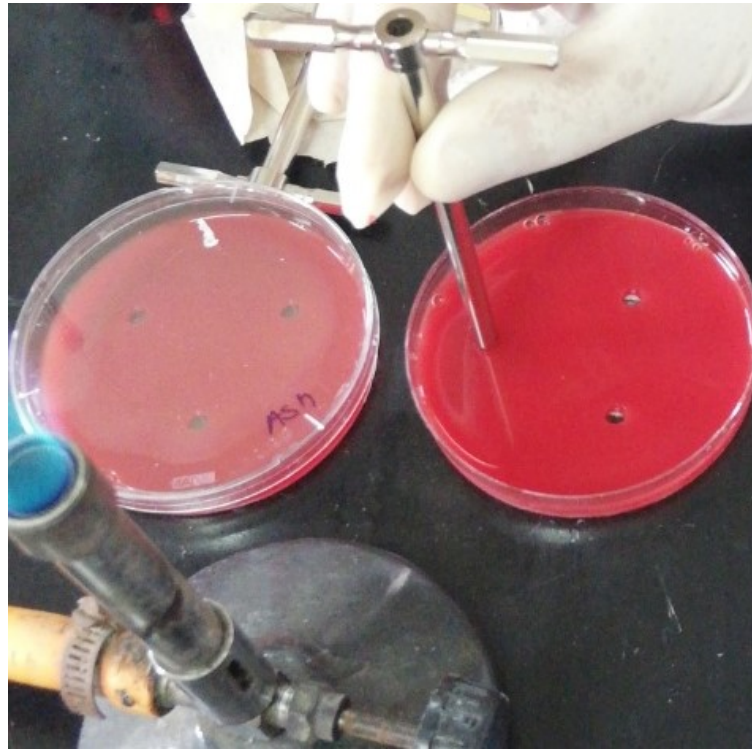
**Fuente** Autoras.



**Figura 20.** Dilución de 0,5 de Mc Farland de la *Porphyromonas Gingivalis*.

**Fuente** Autoras.

## PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



**Figura 21.** Elaboración de los pocillos. **Fuente** Autoras.



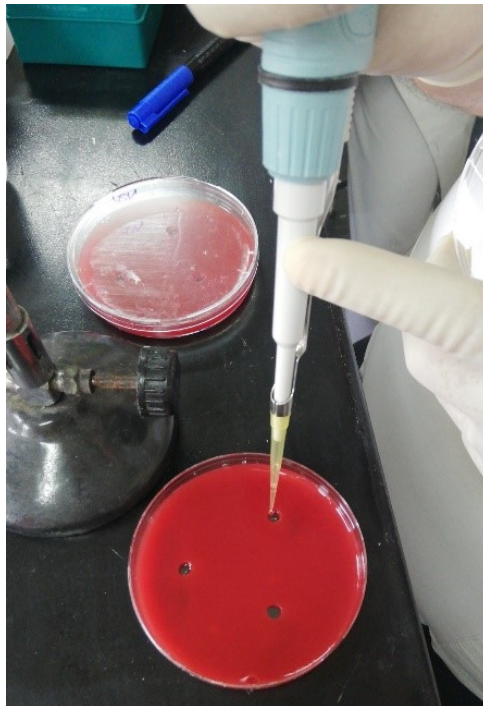
**Figura 22.** Marcación para cada tipo de solución. **Fuente** Autoras.





**Figura 23.** Siembra por diseminación de la *Porphyromonas Gingivalis*.

**Fuente Autoras.**



**Figura 24.** Aplicaron en cada pocillo las soluciones correspondientes.

**Fuente Autoras.**



**Figura 25.** Placas Petri selladas con parafilm y colocadas en jarras de anaerobiosis.

**Fuente Autoras.**



**Figura 26.** Incubadora a 37° C por 24h, 48h y 72h. **Fuente Autoras.**

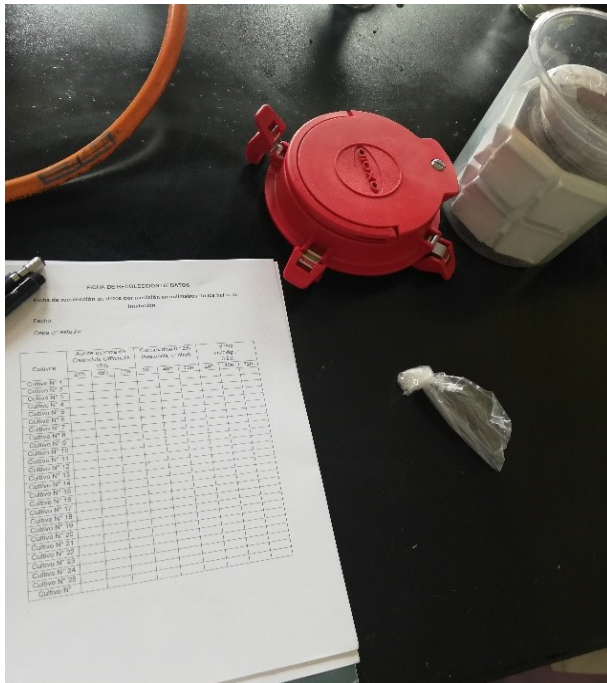


**Figura 27.** Halos de inhibición de acuerdo a cada solución aplicada.

**Fuente** Autoras.



**Figura 28.** Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano. **Fuente** Autoras.



**Figura 29.** Recolección de información en la ficha de recolección de datos.

**Fuente** Autoras.

## ANEXO N°05 Constancia de Siembra in vitro bacteriana y Prueba de Sensibilidad Bacteriana

### CONSTANCIA DE REALIZACIÓN DE SIEMBRA, INCUBACIÓN Y PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA

Microbiólogo Elfer Valdivia Paz-Soldán


Se deja constar que las señoritas Bachilleres: Ramos Ato, Deissy Sthefany y Delgado Trujillo, Mayra Alejandra de la facultad de Medicina Humana, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Nacional Hermilio Valdizán han realizado la siembra, incubación y prueba de sensibilidad de la *Porphyromona Gingivalis* para el desarrollo del proyecto de tesis titulada:

Efecto antibacteriano entre el aceite esencial de *Caléndula Officinalis* 15% y la clorhexidina 0,12% frente a cepas de *porphyromonas gingivalis* (Estudio in vitro).  
Lima - 2019.

Que se llevó a cabo los meses de Noviembre y Diciembre del 2019 en el laboratorio de Microbiología del Hospital Militar Central "Crl Luis Arias Schreiber", a cargo del microbiólogo Elfer Valdivia Paz-Soldán.

Se expide la presente constancia para los fines que sean convenientes.

Lima, 27 de diciembre del 2019

  
Elfer Valdivia Paz-Soldán.  
ELFER VALDIVIA PAZ-SOLDÁN  
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO  
C.B.R. 4422

**VALIDACION DE FICHA DE RECOLECCIÓN DE  
DATOS, MATRIZ DE CONSISTENCIA**

**ANEXO N°06 VALIDACION DE FICHA DE RECOLECCION DE DATOS**

**Jefe de Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur-  
Lima y del Laboratorio de Microbiología del Hospital Militar Central “Crl Luis  
Arias Schreiber” -Lima Biólogo - Microbiólogo Valdivia Paz- Soldán, Elfer D.**

**INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**DATOS GENERALES**

1. APELLIDOS Y NOMBRES DEL EXPERTO: *Valdivia Paz-Soldán Elfer D*  
 2. GRADO ACADÉMICO: *Biólogo - Microbiólogo*  
 3. CARGO E INSTITUCIÓN DONDE LABORA: *H M C*  
 4. NOMBRE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: EFECTO ANTIBACTERIANO ENTRE EL ACEITE ESENCIAL DE *CALÉNDULA OFFICINALIS* 15% Y LA CLORHEXIDINA 0,12% FRENTE A CEPAS DE *PORPHYROMONA GINGIVALIS* (ESTUDIO IN VITRO). LIMA-2019  
 5. NOMBRE DEL INSTRUMENTO: FICHA  
 6. UTILIDAD: RECOLECCIÓN DE DATOS

**ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN**

INDICADORES DE EVALUACIÓN DEL INSTRUMENTO	CRITERIO CUALITATIVO/ CUANTITATIVO	DEFICIENTE	REGULAR	BUENO	MUY BUENO	EXCELENTE
		1	2	3	4	5
CLARIDAD	ESTA FORMULADO CON LENGUAJE APROPIADO				<i>α</i>	
OBJETIVIDAD	ESTA EXPRESADO EN CONDUCTAS OBSERVABLES					<i>κ</i>
ACTUALIDAD	ADECUADO AL ALCANCE DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA					<i>κ</i>
ORGANIZACIÓN	EXISTE UNA ORGANIZACIÓN LÓGICA				<i>α</i>	
SUFICIENCIA	COMPRENDE LOS ASPECTOS DE CALIDAD Y CANTIDAD					<i>κ</i>
INTENCIONALIDAD	ADECUADA PARA VALORAR LOS ASPECTOS Y ESTRATEGIA DE NUEVO ENFOQUE EDUCACIONAL					<i>α</i>
CONSTANCIA	BASADO EN ASPECTOS TEÓRICOS CIENTÍFICOS DE LA EDUCACIÓN TECNOLÓGICA				<i>α</i>	
COHERENCIA	ENTRE LAS VARIABLES, INDICADORES Y DIMENSIONES					<i>κ</i>
METODOLOGÍA	LAS ESTRATEGIAS RESPONDE AL PROPÓSITO DEL DIAGNOSTICO					<i>κ</i>
CONVENIENCIA	ADECUADO PARA RESOLVER EL PROBLEMA					<i>κ</i>
PAUSABILIDAD	GENERA NUEVAS PAUTAS PARA CONSTRUIR UNA TEORÍA				<i>α</i>	
PROMEDIO DE VALORACIÓN CUANTITATIVA						

**A) VALORACIÓN CUANTITATIVA:**

DE 11-21	NO VALIDO, MEJORAR	
DE 22-32	NO VALIDO, MODIFICAR	
DE 33-43	VALIDO, MEJORAR	
DE 44-55	VALIDO, APLICAR	<i>α</i>

**B) VALORACIÓN CUALITATIVA**  
**C) OPCIÓN DE APLICABILIDAD**

FIRMA: *Elfer D. Paz-Soldán*  
 LIMA: *08* de *10* del *2019*

**Mg. en Recursos Vegetales y Terapéuticos jefe del Laboratorio de Anatomía  
Farmacognosia Vegetal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Biólogo Domingo Iparraguirre León**

**INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN  
DE DATOS**

**DATOS GENERALES**

1. APELLIDOS Y NOMBRES DEL EXPERTO: **IPARRAGUIRRE LEÓN, DOMINGO**
2. GRADO ACADÉMICO: **MAESTRO EN RECURSOS VEGETALES Y TERAPÉUTICOS**
3. CARGO E INSTITUCIÓN DONDE LABORA: **DOCENTE PRINCIPAL F.A.C. CIENCIAS BIOLÓGICAS - UNMSM**
4. NOMBRE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: **EFFECTO ANTIBACTERIANO ENTRE EL ACEITE ESENCIAL DE CALÉNDULA OFFICINALIS 15% Y LA CLORHEXIDINA 0,12% FRENTE A CEPAS DE PORPHYROMONA GINGIVALIS (ESTUDIO IN VITRO). LIMA-2019 .**
5. NOMBRE DEL INSTRUMENTO: **FICHA**
6. UTILIDAD: **RECOLECCIÓN DE DATOS**

**ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN**

INDICADORES DE EVALUACIÓN DEL INSTRUMENTO	CRITERIO CUALITATIVO/ CUANTITATIVO	DEFICIENTE	REGULAR	BUENO	MUY BUENO	EXCELENTE
		1	2	3	4	5
CLARIDAD	ESTA FORMULADO CON LENGUAJE APROPIADO					X
OBJETIVIDAD	ESTA EXPRESADO EN CONDUCTAS OBSERVABLES					X
ACTUALIDAD	ADECUADO AL ALCANCE DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA				X	
ORGANIZACIÓN	EXISTE UNA ORGANIZACIÓN LÓGICA					X
SUFICIENCIA	COMPRENDE LOS ASPECTOS DE CALIDAD Y CANTIDAD					X
INTENCIONALIDAD	ADECUADA PARA VALORAR LOS ASPECTOS Y ESTRATEGIA DE NUEVO ENFOQUE EDUCACIONAL					X
CONSTANCIA	BASADO EN ASPECTOS TEÓRICOS CIENTÍFICOS DE LA EDUCACIÓN TECNOLÓGICA					X
COHERENCIA	ENTRE LAS VARIABLES, INDICADORES Y DIMENSIONES					X
METODOLOGÍA	LAS ESTRATEGIAS RESPONDE AL PROPÓSITO DEL DIAGNOSTICO					X
CONVENIENCIA	ADECUADO PARA RESOLVER EL PROBLEMA					X
PAUSABILIDAD	GENERA NUEVAS PAUTAS PARA CONSTRUIR UNA TEORÍA				X	
PROMEDIO DE VALORACIÓN CUANTITATIVA						

**A) VALORACIÓN CUANTITATIVA:**

DE 11-21	NO VALIDO, MEJORAR	
DE 22-32	NO VALIDO, MODIFICAR	
DE 33-43	VALIDO, MEJORAR	
DE 44-55	VALIDO, APLICAR	X

- B) VALORACIÓN CUALITATIVA  
C) OPCIÓN DE APLICABILIDAD

FIRMA: .....

LIMA: 30 de Octubre 2019



**Domingo Iparraguirre León  
Biólogo  
CBP. 2219**



**Teniente coronel C.D especialista en Periodoncia del Hospital Militar Central  
"Crl Luis Arias Schreiber" -Lima Gamero Bedregal, Aldo Richard**

**INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

**DATOS GENERALES**

1. APELLIDOS Y NOMBRES DEL EXPERTO: Gamero Bedregal Aldo Richard
2. GRADO ACADÉMICO: Especialista en Periodoncia
3. CARGO E INSTITUCIÓN DONDE LABORA: Asistencial - Hospital Militar Central
4. NOMBRE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: EFECTO ANTIBACTERIANO ENTRE EL ACEITE ESENCIAL DE CALÉNDULA OFFICIALIS 15% Y LA CLORHEXIDINA 0,12% FRENTE A CEPAS DE PORPHYROMONA GINGIVALIS (ESTUDIO IN VITRO). LIMA-2019
5. NOMBRE DEL INSTRUMENTO: FICHA
6. UTILIDAD: RECOLECCIÓN DE DATOS

**ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN**

INDICADORES DE EVALUACIÓN DEL INSTRUMENTO	CRITERIO CUALITATIVO/ CUANTITATIVO	DEFICIENTE	REGULAR	BUENO	MUY BUENO	EXCELENTE
		1	2	3	4	5
CLARIDAD	ESTA FORMULADO CON LENGUAJE APROPIADO				✓	
OBJETIVIDAD	ESTA EXPRESADO EN CONDUCTAS OBSERVABLES					✓
ACTUALIDAD	ADECUADO AL ALCANCE DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA					✓
ORGANIZACIÓN	EXISTE UNA ORGANIZACIÓN LÓGICA				✓	
SUFICIENCIA	COMPRENDE LOS ASPECTOS DE CALIDAD Y CANTIDAD					✓
INTENCIONALIDAD	ADECUADA PARA VALORAR LOS ASPECTOS Y ESTRATEGIA DE NUEVO ENFOQUE EDUCACIONAL				✓	
CONSTANCIA	BASADO EN ASPECTOS TEÓRICOS CIENTÍFICOS DE LA EDUCACIÓN TECNOLÓGICA					✓
COHERENCIA	ENTRE LAS VARIABLES, INDICADORES Y DIMENSIONES					✓
METODOLOGÍA	LAS ESTRATEGIAS RESPONDE AL PROPÓSITO DEL DIAGNOSTICO					✓
CONVENIENCIA	ADECUADO PARA RESOLVER EL PROBLEMA					✓
PAUSABILIDAD	GENERA NUEVAS PAUTAS PARA CONSTRUIR UNA TEORÍA					✓
PROMEDIO DE VALORACIÓN CUANTITATIVA						

**A) VALORACIÓN CUANTITATIVA:**

DE 11-21	NO VALIDO, MEJORAR	
DE 22-32	NO VALIDO, MODIFICAR	
DE 33-43	VALIDO, MEJORAR	
DE 44-55	VALIDO, APLICAR	✓

- B) VALORACIÓN CUALITATIVA  
C) OPCIÓN DE APLICABILIDAD

FIRMA: \_\_\_\_\_

LIMA: 22 de Octubre del 2019  
ALDO GAMERO BEDREGAL  
Teniente Coronel EF  
Asistencial del Servicio de Periodoncia  
COP 7550 RNE 907

**Teniente Coronel C.D especialista en Medicina y Patología Oral del Hospital  
Militar Central "Crl Luis Arias Schreiber" -Lima C.D. Escobar Melgar,  
Gustavo**

**INFORME DE OPINIÓN DE EXPERTOS DEL INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN  
DE DATOS**

**DATOS GENERALES**

1. APELLIDOS Y NOMBRES DEL EXPERTO: ESCOBAR MELGAR GUSTAVO
2. GRADO ACADÉMICO: Esp. Medicina y Patología Estomatológica.
3. CARGO E INSTITUCIÓN DONDE LABORA: HMC.
4. NOMBRE DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: EFECTO ANTIBACTERIANO ENTRE EL ACEITE ESENCIAL DE CALÉNDULA OFFICINALIS 15% Y LA CLORHEXIDINA 0,12% FRENTE A CEPAS DE PORPHYROMONA GINGIVALIS (ESTUDIO IN VITRO). LIMA-2019
5. NOMBRE DEL INSTRUMENTO: FICHA
6. UTILIDAD: RECOLECCIÓN DE DATOS

**ASPECTOS DE LA VALIDACIÓN**

INDICADORES DE EVALUACIÓN DEL INSTRUMENTO	CRITERIO CUALITATIVO/ CUANTITATIVO	DEFICIENTE	REGULAR	BUENO	MUY BUENO	EXCELENTE
		1	2	3	4	5
CLARIDAD	ESTA FORMULADO CON LENGUAJE APROPIADO					X
OBJETIVIDAD	ESTA EXPRESADO EN CONDUCTAS OBSERVABLES					X
ACTUALIDAD	ADECUADO AL ALCANCE DE LA CIENCIA Y LA TECNOLOGÍA				X	
ORGANIZACIÓN	EXISTE UNA ORGANIZACIÓN LÓGICA					X
SUFICIENCIA	COMPRENDE LOS ASPECTOS DE CALIDAD Y CANTIDAD					X
INTENCIONALIDAD	ADECUADA PARA VALORAR LOS ASPECTOS Y ESTRATEGIA DE NUEVO ENFOQUE EDUCACIONAL					X
CONSTANCIA	BASADO EN ASPECTOS TEÓRICOS CIENTÍFICOS DE LA EDUCACIÓN TECNOLÓGICA					X
COHERENCIA	ENTRE LAS VARIABLES, INDICADORES Y DIMENSIONES					X
METODOLOGÍA	LAS ESTRATEGIAS RESPONDE AL PROPÓSITO DEL DIAGNOSTICO					X
CONVENIENCIA	ADECUADO PARA RESOLVER EL PROBLEMA					X
PAUSABILIDAD	GENERA NUEVAS PAUTAS PARA CONSTRUIR UNA TEORÍA				X	
PROMEDIO DE VALORACIÓN CUANTITATIVA						


**A) VALORACIÓN CUANTITATIVA:**

DE 11-21	NO VALIDO, MEJORAR	
DE 22-32	NO VALIDO, MODIFICAR	
DE 33-43	VALIDO, MEJORAR	
DE 44-55	VALIDO, APLICAR	X

- B) VALORACIÓN CUALITATIVA  
C) OPCIÓN DE APLICABILIDAD

FIRMA: .....

LIMA: 15 de Octubre del 2019

 \*\*\*\*\*  
 52758234710-04  
 GUSTAVO ESCOBAR MELGAR  
 TTE CRL SAN ODO  
 ESP MEDICINA Y PATOLOGIA ORAL  
 COP 08749 RINF 206

## ANEXO N°07 FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

### Ficha de recolección de datos por medición en milímetros de los halos de inhibición

Fecha:

Cepa en estudio:

### ANEXO N° 08 MATRIZ DE CONCISTENCIA

Cultivos	Aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> 15%			Clorhexidina 0.12% (Sustancia control)			Suero Fisiológico 0.9%		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
Cultivo N° 1									
Cultivo N° 2									
Cultivo N° 3									
Cultivo N° 4									
Cultivo N° 5									
Cultivo N° 6									
Cultivo N° 7									
Cultivo N° 8									
Cultivo N° 9									
Cultivo N° 10									
Cultivo N° 11									
Cultivo N° 12									
Cultivo N° 13									
Cultivo N° 14									
Cultivo N° 15									
Cultivo N° 16									
Cultivo N° 17									
Cultivo N° 18									
Cultivo N° 19									
Cultivo N° 20									
Cultivo N° 21									
Cultivo N° 22									
Cultivo N° 23									
Cultivo N° 24									

**TITULO: EFECTO ANTIBACTERIANO ENTRE EL ACEITE ESENCIAL DE CALÉNDULA OFFICINALIS 15% Y LA CLORHEXIDINA 0,12% FRENTE A CEPAS DE PHORPHYROMONAS GINGIVALIS (ESTUDIO IN VITRO).**

**LIMA-2019**

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLE	METODOLÓGIA	INSTRUMENTO
<p><b>1. PROBLEMA GENERAL</b> ¿Cuál es la diferencia del efecto antibacteriano entre aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> 15% y la Clorhexidina 0.12% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i>. (Estudio in vitro).Lima-2019?</p> <p><b>2. PROBLEMAS SECUNDARIOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ¿Cuál es el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> al 15% a las 24, 48 y 72 horas frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i>. (Estudio in vitro).Lima-2019?</li> <li>• ¿Cuál es el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas de la Clorhexidina 0,12% a las 24, 48 y 72 horas frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i>. (Estudio in vitro).Lima-2019?</li> </ul>	<p><b>1. OBJETIVO GENERAL</b> Determinar la diferencia del efecto antibacteriano del aceite esencial de la <i>Caléndula Officinalis</i> 15% comparado con la Clorhexidina 0.12% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> (estudio in vitro).Lima-2019.</p> <p><b>2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b></p> <p><b>Oe1.</b> Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> al 15% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> a las 24 horas. (Estudio in vitro).Lima-2019.</p> <p><b>Oe2.</b> Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> al 15% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> a las 48 horas. (Estudio in vitro).Lima-2019.</p> <p><b>Oe3.</b> Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas del aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> al 15% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> a las 72 horas. (Estudio in vitro).Lima-2019.</p> <p><b>Oe4.</b> Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas de la Clorhexidina 0.12% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> a las 24 horas (Estudio in vitro).Lima-2019.</p> <p><b>Oe5.</b> Cuantificar el efecto en los halos de inhibición de colonias bacterianas de la Clorhexidina 0.12% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> a las 48 horas (Estudio in vitro).Lima-</p>	<p><b>HI:</b> El aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> 15% posee mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina 0,12% frente a cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> (estudio in vitro).Lima-2019.</p> <p><b>HO:</b> El aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> 15% no posee mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina 0.12%</p>	<p><b>Variables independiente</b> Tipo de solución</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• A aceite esencial de <i>Caléndula Officinalis</i> 15%</li> <li>• C clorhexidina 0,12%</li> <li>• S uero fisiológico</li> </ul> <p><b>Variable dependiente</b> Efecto en las Cepas de <i>Porphyromonas Gingivalis</i> ATCC® 33277™</p>	<p><b>Nivel:</b> Explicativo</p> <p><b>Tipo:</b> Experimental, Prospectivo, Longitudinal</p> <p><b>Análisis:</b> Analítico</p> <p><b>Población:</b> No tiene población por ser un trabajo in vitro..</p> <p><b>Muestra:</b> 24 placas en medios de cultivo Agar Schaedler con <i>Porphyromonas Gingivalis</i> ATCC® 33277TM.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guía de observación, ficha de recolección de datos</li> <li>• Medición de halos de inhibición en mm según Duraffourd.</li> </ul>

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO "VALDIZAN DE HUÁNUCO"

FACULTAD DE MEDICINA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PATA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

En la ciudad Universitaria de Cayhuayna, a los <sup>04</sup> días, del mes <sup>Marzo</sup> del año dos mil veinte, siendo las <sup>11.00</sup> horas con <sup>00</sup> minutos, y de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la UNHEVAL, se reunieron en el auditorio de la EP de Odontología, los miembros del Jurado calificador de tesis, nombrados con la Resolución N° 044-2020-UNHEVAL-FM-D, de fecha 25.feb.2020, para proceder con la evaluación de la tesis titulada "**EFFECTO ANTIBACTERIANO ENTRE EL ACEITE ESENCIAL DE CALÉNDULA OFFICINALIS 15% Y LA CLORHEXIDINA 0,12 % FRENTE A CEPAS DE PORPHYROMONAS GINGIVALIS (ESTUDIO IN VITRO), Lima – 2019**", elaborado por las alumnas de la EP de Odontología, **DELGADO TRUJILLO, Mayra Alejandra y RAMOS ATO, Deissy Sthefany**, para obtener el **TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA**, conformado el jurado por los siguientes docentes:

- Mg. GONZÁLES SOTO, César Lincoln
- Mg. CHÁVEZ LEANDRO, Miguel Nino
- Mg. BALDEÓN VALLADARES, Luis Alberto
- Mg. TORRES CHÁVEZ, Jubert Guillermo

Finalmente el acto de sustentación de Tesis, el Presidente del Jurado Evaluador indica a los sustentantes y al público presente retirarse de la sala de sustentación por un espacio de cinco minutos para deliberar y emitir la calificación final, quedando los sustentantes **APROBADO**, con la nota de **18** equivalente a **MUY BUENO**, con lo cual se da por concluido el proceso de sustentación de Tesis a horas <sup>11.00</sup>, en fe de lo cual firmamos.

  
Mg. GONZÁLES SOTO, César Lincoln  
**PRESIDENTE**

  
Mg. CHÁVEZ LEANDRO, Miguel Nino  
**SECRETARIO**

  
Mg. BALDEÓN VALLADARES, Luis Alberto  
**VOCAL**

**Observaciones**

- .....  
.....
- Excelente (19 y 20)
  - Muy Bueno (17,18)
  - Bueno (14,15 y 16)