

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



**“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caléndula
officinalis L.* EN *Streptococcus mutans*, PUNO-2019”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. YAIR ANGEL MAQUERA QUISPE

Bach. LESLIE SKARLEHT MONROY TICONA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

CIRUJANO DENTISTA

PUNO – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA

TESIS

“EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caléndula officinalis* L. EN

Streptococcus mutans, PUNO-2019”

PRESENTADA POR:

Bach. Yair Angel Maquera Quispe

Bach. Leslie Skarleht Monroy Ticona



PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

CIRUJANO DENTISTA

APROBADA POR:

PRESIDENTE:


Dr. Marco Herminio Manzaneda Peralta

PRIMER MIEMBRO:


D.Sc. Vilma Mamani Cori

SEGUNDO MIEMBRO:


M.Sc. Kandy Faviola Tuero Chirinos

DIRECTOR / ASESOR:


Mg. Gian Carlo Valdez Velazco

Área : Biología, crecimiento y desarrollo craneofacial

Tema : Fitoterapia y microbiología oral.

Fecha de sustentación: 11 de noviembre del 2019

DEDICATORIAS

Quiero dedicarle este trabajo
A Dios que me ha dado la vida, fortaleza
y la capacidad de seguir estudiando y aprendiendo,
A mis padres por estar ahí cuando más los necesité;
por su apoyo moral y económico,
en especial a mi mamá Yolanda y abuelita Lucía por su ayuda
y constante cooperación y a mis amigos por
ayudarnos en los momentos más difíciles.
Con cariño *L. Skarleht Monroy Ticona.*

Dedico este trabajo
A Dios mi único y fiel amigo,
A mis padres, por su apoyo incondicional,
Y a las personas especiales que en el futuro serán parte de mi vida.
Con cariño *Yair A. Maquera Quispe.*

AGRADECIMIENTOS

A mi querida mamá por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mi padre por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mi hermana por ser el ejemplo de una hermana madura y de la cual aprendí aciertos y de momentos difíciles, A mis hermanos menores por siempre demostrarme el lado divertido y positivo de las cosas. A mi abuelita por siempre estar al pendiente de la familia y en específico de mí. A mis mejores amigos Jhon, Jenny, Yénida, Mary, Lucero, Brayán y a todos aquellos que ayudaron directa o indirectamente a realizar este documento, con cariño *L. Skarleht Monroy Ticona.*

A mi mamá y a mi papá por su amor y su continuo apoyo en mi carrera profesional y a todas las personas que hicieron posible su culminación con cariño *Yair A. Maquera Quispe.*

ÍNDICE GENERAL**ÍNDICE DE FIGURAS****ÍNDICE DE TABLAS****ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

RESUMEN	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUCCIÓN	12
FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	13
HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 ANTECEDENTES:	15
2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES	15
2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES	20
2.1.3 ANTECEDENTES LOCALES	21
2.2. MARCO TEÓRICO	23
2.2.1. La <i>Calendula Officinalis</i> Linn.	23
2.2.2. Medicina alternativa	27
2.2.3. Infecciones orales	28
2.2.4. Microorganismos orales	28
2.2.5. Medios de cultivo	29
2.2.6. Actividad antimicrobiana	30
2.2.7. Extracción de principios activos	31
III. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Ubicación geográfica de la investigación	34
3.2. Periodo de duración de la investigación	34
3.3. Tipo y diseño de la investigación	34
3.4. Población	34
3.5. Muestra	34

3.6. Operacionalización de variables.....	35
3.7. Técnicas y procedimientos	35
3.8. Instrumentos	40
3.9. Materiales	40
3.10. Consideraciones éticas.....	41
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1. RESULTADOS	42
4.2. DISCUSIÓN	62
V. CONCLUSIONES	65
VI. RECOMENDACIONES	66
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	71
ANEXO A	71
ANEXO B	74
ANEXO C	75
ANEXO D	76
ANEXO E	77
ANEXO F.....	78
ANEXO G	79
ANEXO H.....	80
ANEXO I	87

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1.- Actividad antibacteriana en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula officinalis a las 24, 48 y 72 horas.....	42
FIGURA N° 2.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Calendula officinalis al 25% en 24, 48 y 72 horas.	44
FIGURA N° 3.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula Officinalis al 50% en 24, 48 y 72 horas.	46
FIGURA N° 4.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula officinalis al 75% en 24, 48 y 72 horas.	48
FIGURA N° 5.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula officinalis al 100% en 24, 48 y 72 horas.	50
FIGURA N° 6.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del agua destilada (control negativo) en 24, 48 y 72 horas.....	52
FIGURA N° 7.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) de la Clorhexidina al 0.12% (control positivo) en 24, 48 y 72 horas.....	54
FIGURA N° 8.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 24 horas.	56
FIGURA N° 9.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 48 horas.	58
FIGURA N° 10.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 72 horas.	60

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1.- Actividad antibacteriana en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula officinalis a las 24, 48 y 72 horas..... 42

TABLA N° 2.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Calendula officinalis al 25% en 24, 48 y 72 horas. 44

TABLA N° 3.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula officinalis al 50% en 24, 48 y 72 horas. 46

TABLA N° 4.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula officinalis al 75% en 24, 48 y 72 horas. 48

TABLA N° 5.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de Caléndula officinalis al 100% en 24, 48 y 72 horas. 50

TABLA N° 6.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del agua destilada (control negativo) en 24, 48 y 72 horas..... 52

TABLA N° 7.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) de la Clorhexidina al 0.12% (control positivo) en 24, 48 y 72 horas..... 54

TABLA N° 8.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 24 horas. 56

TABLA N° 9.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 48 horas. 58

TABLA N° 10.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 72 horas. 60

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

- **MSA:** Agar Mitis Salivarius
- **MSAB:** Agar Mitis Salivarius con Bacitracina
- **INS:** Instituto Nacional de Salud
- **OMS:** Organización mundial de la Salud
- **MIC:** Concentración mínima Inhibitoria
- **MIB:** Concentración mínima bactericida
- **ISG:** Índice de sangrado gingival
- **IHO:** Índice de Higiene Oral
- **NCCLS:** National Commitee for Clinical Laboratory Standars
- **GSH:** Glutación reducido
- **SOD:** Superoxido dismutasa
- **CAT:** Catalasa
- **MDA:** Malondialdehido
- **CLO:** Calendula Officinalis
- **HPLC:** Cromatografía liquida de alta resolución
- **KDa:** KiloDalton
- **TNF-a:** Factor de necrosis tumoral-a
- **IICASB:** Instituto de Investigaciones en Ciencias Ambientales, Salud y Biodiversidad

RESUMEN

La enfermedad bucodental más frecuente a nivel mundial y regional es la caries y en diferentes regiones se ha investigado e innovado con múltiples tratamientos alternativos, como la *Calendula officinalis L.* que tiene diversas propiedades terapéuticas, entre ellas su actividad antimicrobiana, sin embargo en Puno estas propiedades son desconocidas, así que el propósito de la presente investigación fue evaluar *in vitro* la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Calendula Officinalis L.* en *Streptococcus mutans*, Puno-2019, se realizó una investigación aplicada, prospectiva, de corte transversal y de diseño cuasi experimental, con cepas de *Streptococcus mutans* aisladas en la misma región, para su evaluación, se cultivaron 30 placas Petri y en cada placa se distribuyeron 6 discos de papel filtro N°4, con un diámetro de 6mm, aplicando la técnica de difusión por disco de Kirby Bauer y pozos de agar modificado, haciendo un total de 180 discos y pozos; las placas Petri se dividieron en 6 grupos de acuerdo a las concentraciones del extracto etanólico de la flor de *Calendula officinalis L.* que se obtuvo por maceración con alcohol al 96%, se diluyó en más alcohol para obtener sus concentraciones de 25% 50% 75% y 100%, también se consideró el control positivo con clorhexidina al 0.12% y control negativo con agua destilada, los resultados obtenidos demuestran que el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50% a las 48 horas tiene un efecto similar al de la clorhexidina al 0.12% sin diferencias estadísticamente significativas $p=0.21$ y también a las 72 horas con similitudes estadísticamente significativas $p=0.18$ según la prueba U de Mann-Whitney, en cambio la concentración de 75% tuvo la menor efectividad a las 24 horas, con una ligera reducción de su efecto a las 72 horas, concluyendo que el extracto etanólico de la flor de *Calendula officinalis* si tiene actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Streptococcus mutans* en la ciudad de Puno.

Palabras Clave: *Caléndula officinalis*, *Streptococcus mutans*, extracto etanólico, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The most frequent oral and global disease is tooth decay and in different regions it has been researched and innovated with multiple alternative treatments, such as *Calendula officinalis* L. which has various therapeutic properties, including its antimicrobial activity, however in Puno you are properties are unknown, so the purpose of this study was to evaluate *in vitro* antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Calendula officinalis* L. in *Streptococcus mutans*, Puno - 2019, was performed a prospective, cross-sectional and prospective experimental design investigation, with *Streptococcus mutans* strains isolated in the same region, for evaluation, 30 Petri dishes were grown and 6 discs of N°4 filter paper were distributed on each plate, with a diameter of 6mm, applying Kirby Bauer's disk diffusion technique and modified agar wells, making a total of 180 discs and wells; Petri dishes were divided into 6 groups according to the concentrations of the ethanolic extract of the *Calendula officinalis* L. flower, which was obtained by maceration with alcohol to 96%, it was diluted in more alcohol to obtain its concentrations of 25% 50% 75% and 100%, the positive control with 0.12% chlorhexidine and negative control with distilled water were also considered, the results obtained show that the ethanolic extract of *Calendula officinalis* to 50% at 48 hours has a similar effect to that of chlorhexidine 0.12% no statistically significant difference $p = 0.21$ and also at 72 hours with statistically significant similarities $p = 0.18$ according to the Mann-Whitney U test, however, the 75% concentration had the lowest effectiveness at 24 hours, with a slight reduction of its effect at 72 hours, concluding that the ethanolic extract of the *Calendula officinalis* flower did It has antimicrobial activity to *in vitro* against *Streptococcus mutans* in Puno.

Keywords: *Calendula officinalis*, *Streptococcus mutans*, ethanolic extract, antimicrobial activity.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades orales son muy frecuentes a nivel mundial, según la OMS las enfermedades bucodentales más frecuentes son la caries, enfermedades periodontales a nivel de encía, el cáncer de boca, las enfermedades infecciosas, los traumatismos físicos y las lesiones congénitas (1). En nuestra población las enfermedades bucodentales más frecuentes igualmente son las caries, las enfermedades periodontales y las maloclusiones (2). Así también mencionar otro tipo afecciones y complicaciones poco frecuentes como infecciones post exodoncia, estomatitis por uso de prótesis, infecciones por candidiasis, enfermedades neoplásicas y otros, todo ello resulta un problema serio en la salud de nuestra población desde lo más general a casos muy particulares; a pesar de que se haya realizado un correcto tratamiento estas complicaciones se presentan por otros factores ajenos a la práctica odontológica por lo que la actitud a tomar sería la prevención (3).

Con los avances tecnológicos y las investigaciones realizadas en otras regiones en el mundo se ha visto la posibilidad de incorporar e innovar con tratamientos mucho más eficaces, existe un medio entre la innovación y el estudio de alternativas de los tratamientos y esta es la medicina tradicional o natural que necesita de un rigor científico y concreto para la incorporación de esta a la terapéutica actual (4, 5).

La *Calendula Officinalis L.* es muy conocida como planta medicinal en otras regiones sin embargo en nuestra población solo usada como una planta ornamental de jardín. En este caso la *Calendula Officinalis L.* es una planta que se encuentra disponible y crece con normalidad en la nuestra localidad cultivada o de manera natural, pese a eso se ignora por completo la gran cantidad de beneficios que poseen las flores de esta planta en nuestro país y región (6).

Según los antecedentes en otras regiones ha alcanzado gran cantidad de estudios que atribuyen a esta planta con mucho potencial medicinal, como antimicrobiano, antiinflamatorio, regenerativo, e incluso antioxidante e inhibidora del crecimiento de células cancerosas (7-12).

La composición y el potencial medicinal de la planta en la región de Puno se desconoce, lo cual dio muchos motivos para su estudio, que según los hallazgos encontrados podrá favorecer en muchos aspectos en los campos de la periodoncia, cirugía, y odontología

preventiva, con el control de infecciones tanto bacterianas como fúngicas, por sus efectos regenerativos y antiinflamatorios; también su uso para el tratamiento de complicaciones orales para pacientes con cáncer y otras enfermedades sistémicas (7-11) (13,14).

Sin embargo, por el momento, esta investigación pretendió por la frecuencia de enfermedades bucales en la población, iniciar con el principal agente etiológico de la formación de caries, es decir *Streptococcus mutans*, pero existen otros microorganismos que también influyen en la salud bucal como *P. Gingivalis*, *S. aureus*, *Lactobacilos* o *Candida albicans* que están relacionados con enfermedades periodontales e infecciones bucales que podrían ser evaluados en otras investigaciones (15).

Así también no se tiene valoraciones químicas ni parámetros fijos para aprovechar de manera óptima los principios activos de esta planta específicamente de nuestra región, de todas formas, la investigación a pesar de ciertas limitaciones se realizó de manera óptima para dar solución al problema propuesto y evaluar los objetivos.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* L. en *Streptococcus mutans*, Puno-2019?

HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

H1: Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* L. en *Streptococcus mutans*, Puno-2019.

H0: No existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* L. en *Streptococcus mutans*, Puno-2019.

Ha: Existe escasa actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* L. en *Streptococcus mutans*, Puno-2019.

OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* L. en *Streptococcus mutans*, Puno-2019.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Precisar *in vitro* el tamaño del halo inhibitorio por el extracto etanólico de *Calendula Officinalis L.* al 25%, 50%, 75% y 100% en *Streptococcus mutans*.
- Precisar *in vitro* el tamaño del halo inhibitorio en el grupo control con agua destilada en *Streptococcus mutans*.
- Precisar *in vitro* el tamaño del halo inhibitorio en el grupo control con clorhexidina al 0.12% en *Streptococcus mutans*.
- Comparar el tamaño del halo inhibitorio por el extracto etanólico de *Calendula officinalis L.* al 25%, 50%, 75%, y 100%, y el grupo control con clorhexidina al 0.12% y agua destilada en *Streptococcus mutans*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES:

2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Nelofer J. et al (2017), en la ciudad de Srinagar, India se realizó una revisión bibliográfica con el título de “*Calendula officinalis – An important Medicinal Plant With Potencial Biological properties*” donde describe los compuestos químicos y propiedades medicinales de la planta, concluyendo que la planta *Calendula officinalis* posee una gran variedad de efectos fitoquímicos y farmacológicos así que se puede considerar un excelente recurso para nuevas drogas para uso medicinal. Existen muchos reportes acerca de la *Calendula Officinalis* donde se evidencia que tiene alta actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria y antiinflamatorio sin efectos tóxicos, es una planta que promete mucho y necesita una investigación más profunda para la explotación de sus principios activos en el uso como medicina para el tratamiento de diferentes enfermedades (16).

Afanasyeva P. et al (2016), en Samara, Rusia Afirma que la *Caléndula Officinalis* es la más popular entre las plantas medicinales de la federación de Rusia y también en el extranjero; realizan su trabajo de título “*Determination of antimicrobial activity of extracts of Caléndula officinalis flowers*” es una investigación comparativa que determina la actividad antimicrobiana de extractos acuosos y etanólicos de las flores de la *Caléndula officinalis*, se detectó la concentración mínima inhibitoria (MIC) usando el método de doble serie de diluciones en cultivos se pusieron a prueba los siguientes microorganismos: *Bacilus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. El estudio demostró que el espectro más amplio lo tiene el extracto acuoso, así también para la *Pseudomona aeruginosa* la medicina más activa fue la tintura o extracto etanólico (1:10) con 70% de alcohol, para *Escherichia coli* el único que revelo un efecto antimicrobiano fue el extracto acuoso en cambio para el *Bacilus cereus* el más indicado fue la tintura (1:5) con 70% de alcohol y extracto acuoso (1:2) con 70% de alcohol y en caso de la *Candida albicans* la tintura de (1:10) con 70% alcohol mostro la mejor actividad antimicrobiana (17).

Parra R. (2017), en la ciudad de Quito, Ecuador, realiza una investigación con el título “Efecto inhibitorio de extracto de *Calendula officinalis* vs clorhexidina al 2% sobre sepas de *Staphilococcus aureus*” con objetivo de determinar el efecto inhibitorio del extracto

acuoso de la *Calendula officinalis* comparado con los efectos de la clorhexidina al 2%, se recolectaron flores de la planta secas, y se extrajo el extracto acuoso mediante la técnica de maceración continua al 50% y 60%, se cultivó las bacterias en cajas Petri con Agar Müller – Hinton en las cuales se colocó discos blancos embebidos en 20 ul de extracto acuoso y para el control positivo discos embebidos en clorhexidina al 2% y suero fisiológico como control negativo, luego se realizó la medición de halos de inhibición a las 24 horas y 48 horas no se observó diferencias en los halos, En los resultados analizados con las pruebas U de Mann-Whitney y Kruskal- Wallis se concluye que existió inhibición de 8.9mm en la caléndula de 60% de concentración en comparación con la caléndula de 50% que no presentó inhibición con 7.5 mm, Los valores más altos de inhibición fueron de la Clorhexidina al 2% (18).

Chandurkar P. et al (2015), en Bhopal, India, en su investigación “*Antimicrobial activity of aqueous, acetone and methanol extracts of Calendula officinalis L. (Marigold) flower*” se busca determinar la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso, acetónico y metanólico de los pétalos de la flor en 5 tipos de bacterias *Staphilococcus aureus*, *Bacilus Cereus*, *E. Coli*, *Klebsiella spp.* y *Pseudomona aeruginosa*, todos los extractos demostraron buena actividad antibacteriana, para *Staphilococcus aureus* tuvo 26 mm, 15 mm y 14 mm de zona de inhibición de crecimiento con los extractos con metanol, acetona y acuoso respectivamente, *Bacilus cereus* obtuvo 10mm, 16mm y 13.5 mm de inhibición de crecimiento con los extractos con metanol, acetona y acuoso respectivamente, *E. Coli* obtuvo 8.5mm, 14mm y 8 mm de inhibición de crecimiento con los extractos con metanol, acetona y acuoso respectivamente, *Klebsella spp* 6 mm , 6.5mm y 10 mm de inhibición de crecimiento con los extractos con metanol, acetona y acuoso respectivamente, *Pseudomonas aeruginosa* 8.5mm, 10mm y 8mm de inhibición de crecimiento con los extractos con metanol, acetona y acuoso respectivamente, estos resultados confirman la actividad antimicrobiana de la *Caléndula officinalis* y su uso tradicional como terapia contra infecciones bacterianas (19).

Sudhakar M. et al (2013), en la ciudad de Maharashtra, India, afirman que la *Calendula officinalis* es una planta con excelentes propiedades cicatrizantes, antimicrobianas y antiinflamatorios en su estudio llamado “*Evaluation of Calendula officinalis as an antiplaque and antigingivitis agent*” que tuvo por objetivo evaluar la eficacia de la *C. officinalis* en la reducción de placa dental e inflamación gingival, donde se evaluó a 240

pacientes en un rango de edad entre 20 y 40 años con su respectivo consentimiento informado, pacientes con gingivitis con sondaje mayor igual que 3mm con sangrado gingival fueron incluidos en el estudio. Los sujetos fueron asignados aleatoriamente en dos grupos, 120 pacientes en el grupo control y 120 en grupo de prueba, a todos los pacientes del grupo de prueba se recomendó una dilución de 2ml de tintura de caléndula con 6ml de agua destilada enjuagarse la boca una vez por la mañana y otra por la noche durante 6 meses, de igual manera al grupo control pero con 8 ml de agua destilada (placebo) se tomaron parámetros clínicos como el índice de placa(IP), índice gingival(IG), índice de sangrado de surco gingival (ISG) e índice de higiene oral simplificado (IHO -S) se registraron al inicio (primera visita), tercer mes (segunda visita) y sexto mes (tercera visita) por el mismo operador para descartar resultados variables. Se mostró una reducción estadísticamente significativa en los parámetros considerados $P < 0.05$ con algunas varianzas interesantes en cada visita así que dentro de los límites del estudio se concluyó que el enjuague bucal de caléndula es eficaz contra la placa dental y gingivitis complementaria a la descamación (20).

Reis M. et al (2017), en Ceará, Brazil, en su estudio “*The effect of Calendula officinalis on oxidative stress and bone loss in experimental periodontitis*” mencionan que la periodontitis está relacionada con una capacidad antioxidante reducida y el estrés oxidativo induce inflamación y pérdida de hueso que contribuyen a la progresión de las enfermedades periodontales, La *Caléndula officinalis* tiene propiedades antiinflamatoria y antioxidantes demostradas de tal forma que el objetivo de la investigación es evaluar el efecto de la *Caléndula officinalis* en el estrés oxidativo y pérdida de hueso en ratas Wistar sometidas a periodontitis experimental, Se usaron 72 ratas Wistar masculinos divididos en grupos: Naive(negativo), Saline (SAL -control) y Caléndula officinalis (Prueba) (CLO), las ratas recibieron 90mg/kg SAL o CLO 30 minutos antes de la ligadura diariamente durante 11 días, el grupo Naive no experimentó manipulación, después de 11 días los animales fueron sometidos a eutanasia y se recolectaron los maxilares para su análisis de pérdida de hueso alveolar macroscópico, el periodonto fue examinado por microscopia, microscopia electrónica de barrido, microscopia cofocal y polarizada con luz, se realizó exámenes histoquímicos de DKK1, WNT 10b y b-catenina, el tejido gingival fue recolectado y analizado para glutatión reducido (GSH), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y malondialdehído (MDA) los 11 días de ligadura induce pérdida de hueso, descompone fibras de colágeno, aumenta la inmunotinción

DKK1 mientras que reduce las expresiones WNT 10b y B-catenina, la periodontitis reduce la GSH, SOD, CAT y aumenta el MDA todos los hallazgos fueron revertidos por 90mg/kg de CLO, por lo tanto la *Calendula officinalis* reduce el estrés oxidativo, la pérdida ósea y preserva las fibras colágenas en ratas con periodontitis experimental (21).

Tambur Z. et al (2018), en Belgrado, Serbia, realizan un estudio denominado “*inhibitory effects of diferent medicinal plants on Candida albicans growth*” donde evalúan in vitro el efecto antifúngico del extracto etanólico y aceites esenciales de plantas medicinales de Serbia contra la *Candida albicans*, Se obtuvo el extracto etanólico de 5 plantas y sus efectos comparados con los diferentes aceites esenciales de 3 plantas, la sensibilidad de la *C. albicans* frente a las plantas se evaluó con el método de difusión en agar, se estimó que las placas de ensayo contenían 300, 150, 75 y 37.5 ug/ml de extractos activos y 100, 50, 25 y 12.5 ug/ml de aceite esencial activo se pusieron inóculos en la superficie de AGAR dando aproximadamente 106UFC/ml de *C.albicans* no se observaron efectos inhibitorios en *Hypericum perforatum* y *Salvia officinalis* (MIC> 300 ug/ml). El más efectivo fue el extracto etanolico de *Aesculus hippocastanun* (MIC=37.5 ug/ml) y el aceite esencial de *Satureja Kitaibelii* (MIC=12.5 ug/ml). Otras plantas también mostraron un MIC de 25 a 300 ug/ml entre ellas la *Calendula Officinalis* con 300ug /ml que evidencia una buena actividad antifúngica contra *Candida. albicans*, aunque no tanto como las ya mencionadas anteriormente, sin embargo, estos resultados requieren una evaluación clínica (22).

Gorgi J. et al (2004), Macapá, Brasil, realizan estudio denominado “*In-vitro-Untersuchung von Caléndula officinalis, Echinacea angustifolia und Streptococcus mutans*” donde evalúan in vitro el efecto antibacteriano de la *Caléndula officinalis* y la *Echinacea angustifolia* sobre el *Streptococcus mutans* las plantas a usar fueron disueltas en 30% de alcohol etanólico y juntas con los fármacos homeopáticos procesado en "Farmácia Homeopática ArgentumLtda." Las bacterias de *Streptococcus mutans* se cultivaron a partir de una cepa (ATCC - 25175). El procedimiento fue experimental buscando la determinación del mínimo de concentración inhibitoria (MIC), las diluciones fueron inoculadas en las secuencias: 3, 5, 7 y 10 gotas del medicamento de *Caléndula officinalis* y *Echinacea angustifolia* a su vez estas fueron homogenizadas, para la preparación de solución peptonada que contenga las bacterias fue necesaria la estandarización de McFarland, la prueba se realizó por espectrofotometría. Los resultados

mostraron que inhibe el crecimiento bacteriano en comparación con el control solución (30% hidro- solución), cabe señalar que la potenciación y dosificación en los resultados mostró: cuanto mayor sea la dosis, mayor fue la inhibición del crecimiento (23).

Maji S. et al. (2017) , en Karnataka, India, en su investigación “*Efficacy of Calendula officinalis Extract (Marigold Flower) as an Antimicrobial Agent against Oral Microbes: An Invitro Study in Comparison with Chlorhexidine Digluconate*” evaluaron la eficacia del extracto en diferentes microorganismos, entre ellas *Streptococcus Mutans*, determinando sus concentraciones mínimas inhibitorias y concentraciones mínimas bactericidas usando el método de difusión en Agar, demostrando así que la *Calendula officinalis* tuvo mayor efectividad frente al S. mutans en comparación con otros microorganismos, pero su acción tomo más tiempo que el Digluconato de clorhexidina, así también el halo de inhibición del Digluconato de clorhexidina al 0.2% fue de 20mm y de la *Calendula officinalis* 15mm (24).

Ferreira J. et al. (2014), en Brazil, en la ciudad de Paraiba, realizan una investigación de título “*Physical Properties and Antibacterial Activity of Herbal Tinctures of Calendula (Calendula officinalis L.) and Cashew Tree (Anacardium occidentale L.)*” donde evalúan dos plantas, entre ellas la *Calendula officinalis* frente a diferentes microorganismos como *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus Oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 9758), *Entero Fecalis* (ATCC 29212) y *Eikenella corrodens* (ATCC 23834) , estas bacterias fueron reactivadas y puestos a prueba, el control usado fue clorhexidina al 0.12% y como control negativo agua destilada, se usaron tinturas de las plantas en este caso la tintura de *Calendula officinalis* que es una dilución de *Calendula officinalis* al 20% en alcohol al 70% ,según sus resultados muestran mejores halos de inhibición en su concentración más pura 1:1, haciendo que mientras más diluido este menos halo de inhibición, en este caso se evidenció que su mayor halo de inhibición para *Streptococcus mutans* fue de 10.5mm y de la clorhexidina entre 14mm y 17mm (25).

Russo F. et al. (2015) en Lujan, Argentina realizan un estudio de título “Flavonoides de *Calendula officinalis L.* bajo cultivo. Efecto de diferentes fechas de siembra y fertilización” donde evalúan la cantidad de flavonoides que contiene según la fecha de siembra y fertilizantes usados usando un perfil cromatográfico y espectrofotometría para evaluar el contenido total de flavonoides obteniendo que los mejores registros de flavonoides se realizaron en la siembra de junio usando el fertilizante de 46kg de P₂O₅,

esto nos da a entender que las propiedades de la *Calendula officinalis* L. está relacionada con la siembra y fertilizantes utilizados (26).

Agudelo C. (2011) en Santiago de Cali, Colombia, realiza un estudio de título “Aprovechamiento agroindustrial de la *Calendula (Calendula officinalis)* mediante la producción de un gel desinflamatorio a partir de celulosa” donde se ve la realización de un gel desinflamatorio y su estandarización a partir del extracto acuoso de *Calendula officinalis*, aplicando el método de percolación para la extracción de principios activos y filtración al vacío, se identifica los triterpenos mediante espectroscopia ultravioleta luego se realiza la preparación proporcional de los principios activos y el medio a usar en este caso gel (glicerina, celulosa, mentol, esencias de limón, Arkopal y otros) como resultado se logró extraer la cantidad de triterpenos suficientes a partir del extracto acuoso (27).

2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES

Manrique L. (2016), en Lima, Perú, en su investigación “Efectividad antimicrobiana de la clorhexidina y la *Calendula officinalis* en las suturas de seda negra 3/0 pos exodoncia” Determino y comparo la efectividad de la clorhexidina al 0.12% y la *Calendula officinalis* al 15% y al 20% en las suturas de seda negra 3/0 post exodoncia de terceros molares impactadas en comparación con el grupo control. Se trabajó con 80 pacientes, 20 pacientes por grupo, después de la exodoncia se brindó el tratamiento enjuagatorio con la metodología triple ciego, después de 7 días las suturas fueron retiradas y analizadas por el microbiólogo. Las suspensiones, diluciones y siembra en placas Petri fueron realizadas dentro de las 12 horas, se usó el agar manitol salado para el cultivo de *Staphilococcus aureus*, agar Cromogénico Candida para *Candida albicans*, agar Mitis salivarius para *Streptococcus spp*, agar Mitis salivarius más bacitracina para *Streptococcus mutans* y agar McConkey para Enterobacterias. Se encontró diferencias estadísticamente significativas en la reducción de UFC/ml de *Streptococcus spp*, también se encontró mayor reducción de UFC/ml con la clorhexidina al 0.12%, seguido de la *Calendula officinalis* al 20%, se concluyó que la clorhexidina al 0.12% la *Calendula officinalis* al 15% y al 20% poseen mayores reducciones numéricas en cantidades de UFC/ml en comparación con el placebo control (28).

Mongrovejo A. (2014), en Arequipa, Perú, realiza una investigación denominada “Determinación del efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Caléndula officinalis*

L.(Caléndula) en animales de experimentación”, con la finalidad de evaluar el efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Caléndula officinalis* L. en heridas producidas en animales de experimentación, se procedió a la recolección, triturado y mediante el método de percolación se produjo el extracto glicólico al 20% de la planta, este extracto fue estandarizado mediante el análisis cuantitativo de flavonoide quercetina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El extracto estandarizado fue empleado en la elaboración de geles al 5 y 10% usado para evaluar el efecto cicatrizante en 16 ratas de la especie *Rottusnovergicus* divididos en 2 grupos, grupo de prueba y grupo de control positivo y negativo, se realizaron 2 heridas incisivas que involucraron epidermis y dermis de 1cm de largo en cada rata, haciendo un total de 32 heridas , se aplicó a 8 heridas el gel al 5% y a las otras 8 el gel al 10%, después al siguiente grupo se aplicó a 8 heridas el preparado comercial Cicatricure y a las otras 8 heridas se le aplico gel base, esto se realizó por 5 días 2 veces al día y se evaluó mediante el método tensiométrico. Se obtuvo los resultados en pesos gramos necesarios para abrir una herida y para el grupo que recibió gel base fue 188.86 ± 17.27 g, para el grupo tratado con gel al 5% fue 255.95 ± 14.39 g, para el grupo que recibió gel al 10% 294.81 ± 16.38 g y para el grupo tratado con cicatricure el promedio fue 294.64 ± 18 g lo cual demuestra que el gel de *Caléndula officinalis* al 10% tiene la misma eficacia en el proceso de cicatrización que el producto comercial Cicatricure (29).

2.1.3 ANTECEDENTES LOCALES

Cahuana. L. et al (2017), en la ciudad de Puno, Perú, en su estudio “Efectividad inhibitoria in vitro del extracto etanólico del *Eucalyptus globulus* sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Candida Albicans* Puno 2017” donde se determinó el efecto inhibitorio del extracto etanólico del *Eucalyptus globulus* sobre *S. Mutans* y el hongo *Candida Albicans* con diferentes concentraciones 25% 50% 75% y 100% y el método usado fue la técnica de cultivo propuesta por el instituto nacional de salud y para la detección del efecto inhibidor de difusión de pocillos con discos de papel filtro combinado y el método Kirby Bauer. En sus resultados el extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* tiene actividad inhibitoria contra las bacterias *S. mutans* con un halo de inhibición de 11.85mm con una concentración al 25%, 13.3mm para a concentración del 50%, 13.197mm para la concentración del 75% y 15.54mm para una concentración del 100%, en cuanto a la actividad antifúngica se dio los promedios de 9.34 mm para la concentración del 25%, 10.41mm para la concentración del 50%, 11.39mm para la

concentración del 75% y 12.45mm para la concentración de 100% siendo el halo inhibitorio directamente proporcional a la concentración por lo tanto el extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* tiene actividad inhibitoria contra bacterias y hongos *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* respectivamente (30).

Cano D. et al (2017), en Puno. Perú, en su estudio “Efecto inhibitorio in vitro de la infusión y aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* (TARA) sobre las cepas de *Streptococcus mutans* Puno 2017” Determino el efecto inhibitorio de la infusión y aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* sobre *Streptococcus mutans*, la muestra estuvo conformada por 7 cultivos por cada placa Petri haciendo un total de 28 mediciones, se conformó el grupo experimental con infusión y aceite esencial de 50% 75% y 100%, grupo control positivo con clorhexidina al 0.12% y grupo control negativo con agua destilada, Se empleó la técnica propuesta por el Instituto Nacional de salud, y la detección del efecto inhibitor fue a través de la prueba de difusión de pocillos con disco de papel filtro por el método de Kirby Bauer. Se evidencio que la infusión de *Caesalpinia spinosa* (TARA) tiene un efecto inhibitorio sobre el *S. Mutans* de 14.20mm, 16.57 mm y 17.11mm a las 24 horas y un promedio de 12.30mm, 13.39mm y 14.63mm a las 48 horas en sus concentraciones del 50%, 72% y 100% respectivamente, sin embargo su aceite esencial tiene un efecto inhibitorio mayor con un promedio de 18.09mm a las 24 horas y con 15.04mm a las 48 horas concluyendo que a mayor concentración mayor efecto inhibitor y fueron más efectivas a las 24 horas que a las 48 horas (31).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. La *Calendula Officinalis* Linn.

2.2.1.1. Descripción:

La *Caléndula officinalis* L. es una planta anual de la familia *Asteraceae* que se cultiva en todo el mundo, nativa de Europa central, este y sur (32).

La planta comúnmente llamada maravilla o botón de oro crece entre 30 cm y 50 cm de altura, y tiene una raíz de aproximadamente 20 cm y numerosas raíces secundarias delgadas, el tallo es erecto, anguloso, ramificado y descendente desde la base hacia arriba, en la punta de cada tallo esta la cabeza de la flor de color anaranjado o amarillo brillante, compuesta, de 5 a 7 cm que consiste en un epicáliz de numerosos sépalos en arco lanceolado, que están cubiertos por ambos lados por pelos glandulares, Las hojas alternas son casi espatuladas en la base y oblongas a lanceoladas en la parte superior y todas son tomentosas, provistas de pelo. La parte inferior de la flor está formada por flósculos tubulares de color amarillo - anaranjado. Los flósculos del disco son seudohermafroditas pero la hembra es estéril. Los flósculos cigomorfos en el borde son hembras, sus estambres están completamente ausentes y sus ovarios inferiores están más desarrollados que los flósculos tubulares, los frutos solo se forman en las flores hembra, los aquenios o frutos de la heterocarpia son en forma de hoz, curvados y anillados (33-35).

Sus flores son utilizadas tanto desde el punto de vista ornamental como en la preparación de productos para la industria farmacéutica y cosmética (35).

2.2.1.2. Taxonomía (32, 36)

Reino: *Plantae*
Subreino: *Tracheobionta*
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Magnoliopsida*
Subclase: *Asteridae*
Orden: *Asterales*
Familia: *Asteraceae*
Tribu: *Calenduleae*

Género: *Calendula*

Especie: *Calendula Officinalis*.

2.2.1.3. Aspectos Químicos

Los componentes químicos principales que se obtienen de la *Calendula officinalis* son: aceites esenciales, pigmentos xantofílicos y taninos, saponosidos esteroides, terpenos, alcoholes triterpénicos esterificados y libres, ácidos fenólicos, flavonoides y otros (33,37).

2.2.1.3.1. Carbohidratos

Monosacáridos: glucosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, galactosa y ácido galacturónico y polisacáridos: arabinogalactan PS II 25 KiloDalton (kDa) (arabinosa, galactosa), Arabinogalactan PS III 35 kDa (arabinosa, galactosa), mucílago (16).

2.2.1.3.2. Aminoácidos

Presenta una variedad de 15 aminoácidos libres, Prolina, fenilalanina, histidina, lisina, leucina, serina, alanina, valina, arginina, tirosina, asparagina, treonina, glutamato, metionina y aspartato (16).

2.2.1.3.3. Lípidos

Los ácidos grasos presentes son: ácido mirístico, ácido láurico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico y linolénico (16).

2.2.1.3.4. Carotenoides

Posee abundante cantidad de carotenoides que dan a las flores su coloración amarilla. El color depende del contenido del pigmento y del perfil del pigmento. Los pétalos de flor amarilla de Caléndula contienen 19 carotenoides y la flor de naranja contiene 10 carotenoides únicos (16).

2.2.1.3.5. Flavonoides

El contenido de flavonoides depende de la variedad de plantas, el tiempo y el lugar de cultivo, no hay una relación conclusiva entre el color del flósculo y el contenido total de flavonoides de *C. officinalis* sin embargo se necesita más estudios, estos son: la quercetina, rutina, narciso, isoharmnetin, kaempferol (16,37,38).

2.2.1.3.6. Aceites esenciales

Las flores contienen aceites esenciales mínimos en la etapa de pre-floración y el máximo en la etapa de plena floración. Los principales constituyentes de VO son epi- α -muurolol, α -cadinol, α -cadineno, sesquiterpenoles e hidrocarburos sesquiterpénicos (16).

2.2.1.3.7. Terpenoides

La caléndula contiene varios terpenoides, los principales ésteres triterpenoides presentes en la cabeza de la flor de caléndula son palmitato, miristato y faradiol 3-O-laurate. Los alcoholes triterpenos y las saponinas triterpénicas se encuentran en las flores liguladas (16).

2.2.1.3.8. Cumarinas

La cumarina es la molécula madre de la warfarina que actúa como un antagonista de la vitamina K. Poseen una variedad de actividades biológicas que incluyen actividad estrogénica, anticoagulante, fotosensible dérmica, vasodilatadora, antimicrobiana, antihelmíntica, molusquicida, hipnótica, sedante y analgésica (16).

2.2.1.4. Aspectos Farmacológicos

2.2.1.4.1. Actividad Angiogenica y curación de heridas Cicatrizante

El extracto de la *Calendula officinalis* tiene propiedades positivas en la angiogénesis caracterizado por la inducción de neovascularización lo cual significa el incremento de la epitelización en ulceraciones venosas crónicas, solo se recomienda su uso en heridas sin riesgo de infección, ya que la regeneración inmediata evita el drenaje (33, 36).

2.2.1.4.2. Actividad Antiinflamatoria

Está muy asociada a los triterpenos y flavonoides, la fracción triterpénica de un extracto de las flores tuvo una marcada actividad antiinflamatoria y anti-edemática dependiente del tipo de extracto, el extracto acuoso tiene mayores cantidades de flavonoides (33, 36, 39).

2.2.1.4.3. Efecto antioxidante

Los extractos de butanol, etanol y acuoso contienen polifenoles y flavonoides que han demostrado actividad antioxidante, los extractos de glicol propileno de los pétalos y cabezas de flores fueron analizados por peroxidación de lípidos, indicando que tienen

actividad antioxidante y los extractos de pétalos fueron más potentes que las cabezas de flores (33, 36).

2.2.1.4.4. Actividad anticancerígena

La fracción soluble en acetato de etilo del extracto de metanol de las flores de *C. officinalis* ha mostrado actividad citotóxica en in vitro, también usado para prevención de mucositis en pacientes con tratamiento radioterapéutico (33, 36, 14).

2.2.1.4.5. Actividad antihelmíntica

Las flores y hojas secas de la *Caléndula officinalis* posee actividad antihelmíntica se le atribuye este efecto a las saponinas de esta (36).

2.2.1.4.6. Actividad antimicrobiana

Posee actividad antimicrobiana en diferentes bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (33, 39).

También posee excelente actividad frente a la *Candida albicans*, los extractos etanolicos, metanolicos y acuosos tienen buenos resultados se le atribuye a los terpenos oxigenados (sesquiterpenos) su actividad antimicrobiana (33, 36, 17).

Los mecanismos de acción antimicrobianos están muy relacionados con los principales constituyentes de la *Calendula Officinalis L.* que son los triterpenos y los flavonoides, existen varios monoésteres identificados en la *C. Officinalis* seca y son el faradiol-3-O-palmitato, faradiol-3-O-miristato, faradiol-3-O-laurato, arnidiol-3-O-palmitato, arnidiol-3-O-miristato, arnidiol-3-O-laurato, calenduladiol-3-O-palmitato y calenduladiol-3-O-miristato a estos constituyentes se le ha atribuido muchas propiedades como antiinflamatorio, inmunoestimulantes, antibacteriano, antivirales, antiprotozoarios y antineoplásico, sin embargo los mecanismos subyacentes a estos no son muy claros o poco conocidos (40).

Los flavonoides, triterpenos, y ácidos fenólicos tienen actividad antimicrobiana que probablemente se deba a su capacidad para formar complejos con proteínas extracelulares y solubles con las paredes celulares bacterianas, es decir alteran la pared y la membrana microbiana también inhiben enzimas por sus compuestos oxidados mediante interacciones con proteínas inespecíficas (41).

2.2.1.4.7. Actividad antiviral

La tintura de *Calendula officinalis* ha evidenciado suprimir la replicación de herpes simple, influenza A2 e influenza APR8, el extracto acuoso no fue efectivo contra virus, el extracto de cloroformo inhibe la replicación y la transcripción inversa del VIH-1 (33, 36).

2.2.1.4.8. Efectos sobre los fibroblastos gingivales humanos.

Los esteroides más abundantes en *C. officinalis*, que se encontraron laurilo, miristoilo y palmitoilo. La quercetina (flavonoide), un componente activo de la caléndula, disminuye la expresión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleuquina. (IL-1b), IL-6 e IL-8 en forbol 12-miristato 13-acetato y mastocitos humanos estimulados con ionóforo de calcio, estos han sido implicados en enfermedades periodontales. Se encontró también que la proliferación de fibroblastos gingivales depende de la presentación tiempo y concentración de la *Calendula officinalis*, teniendo mayor efectividad el extracto etanolito (21, 33, 42).

2.2.1.4.9. Contraindicaciones

El extracto de *Calendula Officinalis* está contraindicado solo en casos de alergia a la familia de las plantas *Asteraceae* (32).

In vitro se demostró efectos uterotónicos en tejidos de conejos y cobayos y existen reportes anecdóticos reportando que la *Calendula Officinalis* posee efectos espermaticidas y abortivos, su uso en el embarazo y lactancia no se ha demostrado (40).

2.2.1.4.10. Toxicidad

Existe buena cantidad de evidencia que demuestra que los extractos de *Calendula officinalis* no tiene efectos nocivos en el ser vivo. Es decir, no tiene efectos tóxicos, mutagénicos ni genotóxicos (16, 43).

2.2.2. Medicina alternativa

2.2.2.1. Uso en la medicina tradicional

El uso de las flores de la *Calendula officinalis* tiene un amplio espectro en su uso para diferentes afecciones, como antimicrobiano, en úlceras, antifúngico, antiinflamatorio. Arritmias; en el tratamiento de diversas afecciones sistémicas (44).

Desde su punto de vista químico ya antes mencionado, la *Caléndula officinalis* posee múltiples familias químicas carotenoides, flavonoides, triterpenos, saponinas, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, polisacáridos, sustancias peptídicas, hemicelulosas, aceite esencial, confiere muchas propiedades medicinales (16).

2.2.2.2. Uso en la odontología

Los aceites, extractos y tinturas obtenidas de las flores de la *Caléndula Officinalis* usados como cicatrizantes, gingivitis y antimicrobianos y antiinflamatorios prometen muchos beneficios para el uso odontológico (8).

Diversos estudios se han ido desarrollando tratando de demostrar los numerosos efectos positivos de la *Caléndula officinalis* con la posibilidad de tener tratamientos alternativos como enjuagues post exodoncia, enfermedades periodontales, y aplicaciones complementarias a tratamientos a pacientes con cáncer (10, 12, 14, 17, 20).

2.2.3. Infecciones orales

Muchos estudios han revelado una relación importante entre infecciones orales y enfermedades sistémicas sean cardiovasculares, endocrinas pulmonares y otros.

De la tal forma que es importante el tratamiento adecuado y pronto ya que estas enfermedades de manera crónica pueden desarrollar infecciones más complejas e incluso extenderse a diferentes regiones entre ellos los senos paranasales, espacios cervicofaciales, afectar nervios y sistema de sostén los huesos poniendo en riesgo la vida del paciente (28, 45).

2.2.4. Microorganismos orales

La cavidad oral presenta más de 500 especies bacterianas, englobando *Streptococcus*, *Peptoestreptococcus*, *Veilonella*, *Lactobacillus*, *Corynacterium* y *Actinomices*, que representan el 80% de toda la flora cultivable (46, 15).

2.2.4.1. *Streptococcus mutans*

Conocido como patógeno dental también causante de bacteriemia y endocarditis infecciosa tienen su habitat principal en la cavidad oral asociado principalmente con la caries dental, para su cultivo selectivo se necesita Agar Mitis Salivarius (MSA) y para mejores resultados Mitis Salivarius con bacitracina (MSB) con sacarosa al 20% (47, 15).

Es una especie del grupo mutans, de la división de los estreptococos viridans (bacterias más importantes de la cavidad bucal) se halla en un 70% y 90% en sujetos no desdentados o con caries activa, son anaerobios facultativos se desarrollan en condiciones aeróbicas o anaeróbicas y su temperatura optima de desarrollo es de 36 ± 1 °C (15).

2.2.4.1.1. Características

Es un coco Gram positivo en cadena, inmóvil, catalasa negativa, ADN cromosómico con citoplasma, mureína, péptidoglucano (pared celular) membrana celular y ausencia de la capsula.

Es productor rápido de ácido láctico, modifica el pH 7 a pH 4.2 en aproximadamente 24 horas, fermenta la glucosa, la lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina (47).

2.2.4.1.2. Clasificación

Existen muchos criterios para su clasificación por hemolisis podrían ser alfa, beta y gama hemolíticos sin embargo en Agar sangre es alfa o gama hemolítico, raras veces beta hemolítico, los serotipos de *S. Mutans* son c, e f y k; el serotipo c es el más predominante en la cavidad bucal a diferencia de las otras, se adhiere en la superficie dental gracias a los polisacáridos de su pared celular (47, 15).

2.2.5. Medios de cultivo

Para llevar a cabo el estudio de las características y diagnósticos de los microorganismos necesario realizar cultivos, lo medios de cultivo deben de cumplir ciertas características para cada bacteria en específico

Los medios de cultivo reproducen artificialmente el habitat de los microorganismos y proveen las condiciones adecuadas para su crecimiento, no todas las bacterias crecen con los mismos medios nutricionales (15).

2.2.5.1. Composición

Los medios de cultivo están compuestos por Agua, peptonas hidratos de carbono, extracto de carne. Extracto de levadura, suero o sangre de caballo o de carnero, liquido ascítico, vitaminas, cloruro de sodio, minerales y otras sustancias que los microorganismos no puedan sintetizar, agentes solidificantes (agar) (15).

2.2.5.2. Preparación

Consiste en disolver en agua todos los compuestos de la mezcla, se calientan y una vez obtenida una solución homogénea, se ajustan a un PH optimo, después se reparte en frascos o tubos para su esterilización en autoclave, si tienen sustancias termolábiles requieren otro método de esterilización, una vez concluida la esterilización se conserva en frigorífico o también en cajas Petri para su próximo uso (15).

2.2.5.3. Condiciones para el cultivo

Se deben respetar ciertas condiciones para la incubación bacteriana: Temperatura optima $36^{\circ}\pm 1$, atmosfera dependiendo a la respiración del microorganismo, presión osmótica los medios de cultivo poseen cloruro de sodio en 1% suficiente para conseguir la osmolaridad adecuada. Humedad importante para el crecimiento, PH cercanos a la neutralidad (15).

2.2.5.4. Agar Mitis Salivarius y Agar Mitis Salivarius con Bacitracina

Contiene 5% de sacarosa y otras sustancias inhibidoras (telurio potásico, Azul tripan, cristal violeta), usualmente se cultiva en una atmosfera, 5% de dióxido de carbono a 37° C por 1 o 2 días seguida de una incubación al aire de 1 o 2 días sin embargo el más específico usualmente es el agar MSB contiene los mismos componentes, pero con 0,2 U/ml de bacitracina y sacarosa al 20% (47,15).

2.2.6. Actividad antimicrobiana

Toda sustancia que pueda suprimir el crecimiento de microorganismos o destruirlos y que es producida de manera natural o sintetizada artificialmente es denominado antimicrobiano, pueden ser bactericidas o bacteriostáticos respetivamente. (48) Su actividad en cada microorganismo es evaluada por diferentes métodos pueden ser cuantitativas o cualitativas, en las cuantitativas se miden la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) y en las cualitativas (disco difusión) se clasificaran en sensibles o resistentes midiendo los halos inhibitorios según las tablas de la National Commitee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS) (49).

Existen muchos métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana, entre ellos el método de difusión de discos (Kirby Bauer), método de pozos en agar y método de dilución en tubos, cada método mencionado posee ciertos inconvenientes por lo cual se tienen de hacer modificaciones para que sean adecuadas (50).

2.2.6.1. Método Kirby Bauer, discos sensitivos. (Difusión de discos)

Prueba muy usada para medir la susceptibilidad de microorganismos patógenos y fisiopatógenos frente a extractos de diferentes plantas, se realizan los frotis sobre los medios de cultivo, Luego se vierten los extractos estándares y blancos en cada uno de los discos de papel filtro y se colocaron sobre la superficie de cada agar, posteriormente se procede a la medición de los halos de inhibición (50, 51).

2.2.6.2. Método modificado de posos de Agar

Al realizar los frotis en cada uno de los medios selectivos, posteriormente se realizan los posos sobre la superficie de cada agar con ayuda de un sacabocados estéril y en cada poso se vierte los extractos, estándares y blancos, se deja reposar por 30 minutos, se incuban las placas Petri invertidas a de acuerdo a los parámetros de incubación de cada microorganismo (50).

Según Rojas *et al.* (50) el método de posos de Agar mostro mayor sensibilidad en comparación con el método Kirby Bauer.

Sin embargo, Perez *et al.* (52) menciona que en el método de posos de agar se observa difusión de los extractos lo cual crea interferencias en la medición de la actividad antimicrobiana por lo cual el método de discos sensitivos Kirby Bauer permite una mejor interpretación en la medición.

2.2.7. Extracción de principios activos

La fitoquímica que constituye la planta varia en los diferentes extractos de *la Calendula officinalis*, si es extracto de éter de petróleo este va a contener triterpenos y ácidos grasos, si es de extracto metanólico contendrá carbohidratos, glucósidos, saponinas, triterpenos, ácidos grasos y diterpenos, si es extracto etanólico estará constituido por carbohidratos glucósidos, saponinas, triterpenos, ácidos grasos, diterpenos y si es de extracto acuoso tendrá, carbohidratos glucósidos, saponinas, triterpenos, flavonoides y diterpenos (33).

2.2.7.1. Parámetros para la extracción

2.2.7.1.1. Forma de cosecha (recolección):

Se cosechan solo los capítulos florales con sus pedúnculos, no pueden exceder de 2 a 3cm

2.2.7.1.2. Condiciones de secado

Pueden cercase al sol o a la sombra, sin embargo, es preferible secarlo con estufa de aire recirculado a 40°C, se puede almacenar en lugares frescos y secos (53).

La desecación se realiza de manera lenta cuando es necesaria la estimulación enzimática, o puede ser rápida cuando no se requiere, para la inhibición enzimática se requiere eliminar el agua a niveles inferiores a 10% (54).

2.2.7.1.3. Desecación natural

Es lenta y económica, se usan bandejas cobertizas, telas metálicas, papeles (54).

2.2.7.1.4. Desecación artificial

Permite control de la temperatura, humedad y del tiempo que tarda, se puede usar estufas. Túneles de secado, etc.

Las hojas, sumidades y flores deben secarse entre 20°C a 40°C y las cortezas y raíces a 30°C y 65°C (54).

2.2.7.2. Extracto hidroalcohólico o etanólico

Es un extracto de tipo fluido se realiza mediante maceración que es una extracción continua, se realiza a temperatura ambiente, se remoja la planta picada y seca en un solvente en proporciones iguales, hasta que este penetre y disuelva los principios solubles. Con un cierre hermético se deja de 2 a 14 días, con agitaciones esporádicas y después se filtra, se exprime y se recupera el solvente en evaporador rotatorio obteniendo el extracto de acuerdo a los porcentajes esperados, en este caso el solvente no fue evaporado (55, 56).

Se usa alcohol (etanol o también podría ser metanol) como solvente con cualquiera de los métodos de extracción sea en sus concentraciones de 70% o 96% (30, 28).

2.2.7.3. Clasificación (55).

Dependiendo a la concentración del solvente de extracción se pueden clasificar en:

2.2.7.3.1. Extractos fluidos

Son preparaciones que contienen alcohol como disolvente preparado tal que cada mililitro del disolvente contiene 1 gramo del material crudo.

2.2.7.3.2. Extractos secos

Se obtiene al evaporar todo el solvente hasta obtener polvo, se pueden utilizar para preparar tinturas.

2.2.7.3.3. Extractos Semisólidos o blandos

Se obtiene también al evaporar el solvente, pero hasta que tenga una consistencia semisólida que no moja el papel filtro.

2.2.7.3.4. Crioextractos:

Se obtiene con la molturación del producto sometida a congelación -196°C con nitrógeno líquido.

2.2.7.4. Métodos de extracción (55).

2.2.7.4.1. Extracción con solventes

Consiste en extracción de los principios activos de una planta mediante un solvente o mezcla que tiene la capacidad de disolver sus principios activos.

2.2.7.4.2. Extracción discontinua o simultánea:

Existen diferentes métodos y son:

-Maceración

Se realiza a temperatura ambiente, se remoja la planta picada en un solvente proporciones iguales, hasta que este penetre y disuelva los principios solubles, tapado se deja de 2 a 14 días, con agitaciones esporádicas y después se filtra, se exprime y se recupera el solvente en evaporador rotatorio obteniendo el extracto (55, 56).

-Infusión

El agua en ebullición se vierte a la planta en un recipiente cerrado de 5 a 15 minutos

-Digestión

Para plantas de difícil extracción requieren un calor prolongado.

-Decocción

Consiste en mezclar la droga y los solventes hasta la temperatura de ebullición del agua, se debe mantener la temperatura por 15 a 30 minutos (56).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica de la investigación

Se realizó en la Universidad Nacional del Altiplano de la ciudad de Puno, provincia de Puno y departamento de Puno, ubicado en la zona sureste del territorio peruano entre los 13°66'00" y 17°17'30" de latitud sur y los 71°06'57" y 68°48'46" de longitud Oeste del meridiano de Greenwich, con altitud entre los 3810 a 4050 m.s.n.m. a orillas del Lago Titicaca, contando con una población estimada de 128,637 habitantes.

3.2. Periodo de duración de la investigación

La presente investigación de título "Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Calendula officinalis* L. en *Streptococcus mutans*, Puno-2019", fue realizada desde el mes de Julio hasta el mes de septiembre con una duración aproximada de 3 meses.

3.3. Tipo y diseño de la investigación

Nivel de investigación aplicativo, tipo de estudio transversal, prospectivo, experimental de diseño cuasi experimental.

3.4. Población

- Cepa de *Streptococcus mutans*

3.5. Muestra

La muestra fue no probabilística seleccionada por conveniencia según los criterios de inclusión y exclusión, la cepa fue cultivada en 30 placas Petri, con 6 discos de difusión (repeticiones) embebidos del extracto etanólico de *Calendula officinalis* L. en pozos de agar modificado por placa, es decir 180 discos, de las cuales se dividieron en 6 grupos de 5 según a las concentraciones 25%, 50% , 75%, 100% , control positivo (Clorhexidina al 0.12%) y control negativo (agua destilada), 30 discos y pozos por grupo.

3.5.1. Caracterización de la muestra

a. Criterios de inclusión

- Microorganismos que cumplieron con las características macroscópicas y microscópicas según su género y especie.

- Microorganismos que cumplieron con las pruebas bioquímicas.
- Cepas de *Streptococcus mutans* sin contaminación
- Medios de cultivo esterilizados sin contaminación.
- Placas Petri debidamente verificadas sin alteraciones.

b. Criterios de exclusión

- Microorganismos que no cumplieron con las características macroscópicas y microscópicas correspondientes al género y especie requeridos en la investigación.
- Microorganismos que no cumplieron con las pruebas bioquímicas.
- Medios de cultivo alterados o contaminados.
- Cepas de microorganismos contaminados.

3.6. Operacionalización de variables

Variables		Definición operacional	Dimensión	Indicadores	Valor	Escala
Variable independiente	Extracto etanólico de <i>Calendula Officinalis L.</i> (Cualitativa)	Los principios activos de la <i>Caléndula officinalis</i> serán extraídas en alcohol al 96% (28).	-Concentración del extracto -Agua destilada -Clorhexidina al 0.12%	Aplicación del extracto etanólico al 25%, 50%, 75% y 100%	% Concentración	Ordinal
Variable dependiente	Actividad antimicrobiana (Cuantitativa)	Capacidad de alguna sustancia de suprimir el crecimiento de microorganismos o destruirlos. (48).	Halo de inhibición de crecimiento	Medición	Milímetros (mm)	De razón

3.7. Técnicas y procedimientos

3.7.1. Obtención de la *Caléndula officinalis L.*

La *Caléndula officinalis* es una planta anual de la familia Asteraceae que se cultiva en todo el mundo, nativa de Europa central, este y sur.

La recolección de la planta se realizó en el jardín de una pobladora de la ciudad de Puno que se encuentra en el altiplano entre los 3,812 y 5,500 msnm, antes de la recolección se

tomó una muestra para su verificación con un experto en taxonomía.

Una vez identificada taxonómicamente por el M.Sc. Alfredo Loza del Carpio, Director del Instituto de Investigaciones en Ciencias Ambientales, Salud y Biodiversidad (IICASB) de la Universidad Nacional del Altiplano, véase ANEXO B, se procedió a la recolección, dicha recolección fue realizada en aproximadamente 45 minutos, primeramente se roció agua embotellada para limpiarla de polvo u otros contaminantes, después se extrajo la flor con sus pedúnculos que no fueron mayores a 2 cm, posteriormente se procedió al secado o deshidratación de la planta.

3.7.2. Preparación del extracto etanólico de la *Caléndula officinalis* L.

Para el secado, inmediatamente después de su recolección, se llevó a una estufa donde estuvo 24 horas a 40°C, no se realizó el secado por 48 horas como se menciona en la literatura, ya que no se tuvo a disposición una estufa de aire recirculado, lo cual permite que se mantenga una temperatura uniforme, entonces el tiempo de secado en la estufa se redujo, para evitar quemar las flores (28,54).

Al retirarlas fueron colocadas en una caja de anaerobiosis para evitar su rehidratación y contaminación, mientras se realizaba por partes la trituración de las flores usando morteros.

Posterior a la trituración se pesó 150 gramos de polvo de la flor seca y en una probeta se midió 450 ml de alcohol al 96%, la relación de alcohol- polvo fue de 3/1, luego en una botella ámbar de 1 litro, la flor triturada fue macerada en alcohol hasta que este disuelva los principios activos solubles.

La maceración se realizó a temperatura ambiente, estuvo con un sellado hermético durante 15 días, con agitaciones esporádicas, después se filtró 3 veces con papel filtro N°04 mediante el método de filtración por gravedad como se indica en la bibliografía (28, 56).

3.7.3. Preparación del medio de cultivo para aislamiento de *Streptococcus mutans*

A. Obtención de muestra

Se obtuvo la muestra de zonas cariosas de los molares de una persona, esta muestra fue llevada a un tubo de ensayo estéril con caldo nutritivo, posteriormente se incubó por 24 horas.

B. Preparación de agar sangre

- Se pesaron los ingredientes según las proporciones que indica el fabricante con disolución en calor (Agar base y agua destilada).
- Se esterilizó en autoclave a 121°C a 15 libras de presión/pulgada por 15 minutos después que haya alcanzado la temperatura programada.
- Se dejó enfriar hasta 45 - 50°C.
- Se añadió asépticamente la sangre (humana) en proporción de 5%.
- Se homogenizo la mezcla para verterlo en las placas Petri.
- Se dejó solidificar (Gelación del agar).

C. Aislamiento y siembra

- Se inocularon vertiendo los microorganismos en medios de cultivo adecuado (agar sangre) para que se desarrollen y multipliquen en condiciones óptimas.
- Se realizó la siembra por Trasplante.
- Se incubó a 37°C por 24 horas en anaerobiosis.
- Se incubó a 37°C por 24 horas en aerobios

El medio de cultivo Agar sangre nos sirvió para determinar el efecto hemolítico de la bacteria e identificar si es alfa o beta hemolítico y así proceder a su aislamiento, la identificación de colonias de *Streptococcus mutans*, se realizó en base a la observación de la morfología de las colonias y la hemólisis en el Agar

Procedimiento

1. Se esterilizó el asa de Kolle por flameado.
2. Se dejó enfriar.
3. Se tomó con la mano izquierda el tubo con la muestra con una leve inclinación para evitar la contaminación con microorganismos del medio ambiente, se trabajó cerca del mechero.
4. Con la mano derecha, se sostuvo el asa y con apoyo del dedo meñique, se sacó la lámina metálica del tubo con la cepa, luego se flameó la boca del tubo, e introdujo el asa sin tocar las paredes y se cargó con las cepas inoculadas en el caldo.
6. Se flameó de nuevo la boca del tubo, y se tapó con la lámina metálica.
7. Inmediatamente se tomó la placa Petri con el medio de cultivo y se apoyó el asa sobre la superficie realizando estrías sin romper el medio de cultivo.

8. Se flameo nuevamente el asa de Kolle.
9. Se rotulo la placa Petri, con el nombre y fecha.
10. Se Incubo en la estufa a 37°C por 24 horas en anaerobiosis y 24 horas en aerobiosis.
11. Transcurrido el tiempo se realizó la observación.

3.7.4. Observación y selección de colonias de *Streptococcus. Mutans*

- La morfología macroscópica de las colonias a escoger fueron opacas, convexas e irregulares en su forma y superficie granular.
- Para el estudio microscópico se usó la tinción de Gram, con cristal violeta, lugol, alcohol acetona y safranina.
- Una vez identificados los microorganismos se transportaron las cepas seleccionadas de las diferentes colonias a tres tubos de ensayo, cuidadosamente esterilizados, contenidos de 3 ml. de solución peptonada, luego se llevaron a la incubadora por 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se realizó nuevamente la identificación microscópica con la tinción Gram para asegurarse de que es la cepa bacteriana indicada.
- A la observación en el microscopio (100X) se apreció la bacteria buscada (Cocos Gram positivos que se asocian en parejas de cadenas cortas y largas) con invasión de bacilos (Bacterias alargadas en forma de barra)
- Para lograr la pureza de la cepa se realizó un nuevo sembrado con la finalidad de eliminar la contaminación de bacilos.
- Se sembró colocando las bacterias en un medio de cultivo selectivo (Agar Mitis Salivarius con bacitracina al 0.2 U x 100 ml y 20% de sacarosa).
- Se cultivó en una atmosfera de, 5% de dióxido de carbono (anaerobiosis) a 37° C por 24 horas seguida de una incubación al aire (aerobiosis) de 24 horas, esto fue necesario para que las bacterias buscadas se desarrollen y se llegue a la pureza requerida, posteriormente se realizó una nueva observación microscópica y efectivamente se evidencio la cepa al 99% de pureza.

3.7.5. Preparación del medio de cultivo para las pruebas de actividad antimicrobiana

- Se preparó el medio de cultivo correspondiente a la prueba, que es el Agar Müller Hinton con 5% de Sangre, según los estándares del Instituto Nacional de Salud (INS).
- Se esterilizo en autoclave, 2 matraces con 300ml del medio de cultivo Müller Hinton, para mezclarlos con 30ml (5%) de Sangre y verterlos posteriormente en 30 placas Petri,

- distribuyendo 20 ml para cada placa.
- Para inocular la cepa de *Streptococcus mutans* en el Agar Müller Hinton, se realizó antes la estandarización de McFarland con el fin de homogenizar la población de bacterias en cada placa, se usó sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de McFarland) y se suspendió las colonias de *Streptococcus mutans* en suero fisiológico para compararlas con el estándar de turbidez hasta obtener la turbidez adecuada.
 - Una vez estandarizada, se procedió a la inoculación de la bacteria en Agar Müller Hinton con 5% de sangre, con mucho cuidado, se aplicaron los procedimientos ya descritos anteriormente.
 - Después de 10 minutos se aplicó la técnica de difusión en disco y posos en agar modificado, realizando los posos en agar con un sacabocados y distribuyendo los discos de papel filtro N°4 en cada pozo, haciendo un total de 6 discos por placa Petri, distribuidos en una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas del Instituto Nacional de Salud (INS) fue de 6 mm), las placas fueron agrupadas en diferentes grupos, 5 placas Petri por grupo, los grupos de prueba tenían extracto etanólico de *Caléndula officinalis* en diferentes concentraciones; al 100% , 75%, 50% y 25%; así también los grupos de control fueron; Clorhexidina al 0.12% y agua destilada, todas las soluciones fueron distribuidas con una micropipeta a 10 ul por pozo haciendo un total de 180 pozos y discos.
 - Después de sellar herméticamente las placas Petri, se llevaron a una estufa con una temperatura de 37°C durante 24, 48 y 72 horas para su posterior evaluación y recolección de datos.

3.7.6. Plan de recolección de datos

Para la recolección de datos se realizó 5 veces la medición del halo inhibitorio por cada disco con las concentraciones del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 25%, 50%, 75% y 100% y también los controles con Clorhexidina al 0.12% y el agua destilada en todas las placas, luego se registraron todos los datos en la ficha de recolección en 24, 48 y 72 horas.

3.7.7. Análisis estadísticos

Se procesó los de datos, mediante estadística descriptiva con media, mediana, desviación estándar, varianza, grafico de cajas y bigotes, luego se usó estadística inferencial, según las pruebas de normalidad, los datos no tenían una distribución normal así que se

realizaron pruebas no paramétricas, en este caso la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas, H de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para muestras independientes, finalmente se Interpretaron los datos y se pueden visualizar en la sección de resultados.

3.8. Instrumentos

- Fichas de recolección de datos

3.9. Materiales

- 4 kilos de flores de Calendula officinalis
- 10 pliegos de papel Kraft
- Balanza analítica
- Estufa (VWR)
- Triturador
- Autoclave
- 01 microscopio (Marca Zeizz Serie- Nr:3116014785- Alemania)
- Esterilizadora para laboratorio de 30L
- 01 caja de anaerobiosis
- 02 morteros
- 02 frascos de vidrio color ámbar de 1L de cierre hermético
- 06 vasos de precipitado
- 03 matraces Erlenmeyer
- 01 probeta
- 03 embudos
- Pipeta Bravo de 10 ml
- 04 pliegos de papel filtro N°06
- 200 discos de sensibilidad
- 15 tubos de ensayo
- 01 pinza de madera
- 03 pinzas de metal
- 06 varillas de agitación
- 30 placas Petri
- 03 botellones de agua mineral
- 02 laptops
- Vernier (Uyustools, largo: 150mm, precisión: 0.02mm)

- 01 caja de papel aluminio
- 01 frasco de suero fisiológico de 100ml
- 01 frasco de alcohol de mechero
- 30 hisopos estériles
- 01 paquete de algodón
- 01 frasco de lejía
- 01 cocina eléctrica
- 01 mechero bunsen

Equipo básico de bioseguridad:

- Mandil blanco
- 01 caja de Guantes descartables
- 01 caja de barbijos
- 01 caja de gorros desechables de laboratorio

Medios de cultivo y soluciones:

- Medios de cultivo (Agar Mitis Salivarius más Bacitracina, Agar Base, Agar Mueller Hinton)
- Caldos (Trypticase de soya, Caldo peptonado)
- 01 frasco de Clorhexidina al 0.12%
- 01 litro de agua destilada estéril
- 02 botellas de alcohol al 96%

Recursos virtuales:

- Programa de Microsoft Word, Microsoft Excel, IBM SPSS Statistics 25.

Infraestructura:

- Laboratorio de control de calidad de la Facultad de Ingeniería Química.
- Laboratorio de Microbiología de la facultad de Medicina Humana

3.10. Consideraciones éticas

Se tuvo en cuenta las respectivas certificaciones, limitaciones y normas de bioseguridad para el manejo de microorganismos en el laboratorio, también se pidieron los respectivos permisos para el uso de los laboratorios en la decanatura de cada facultad, ingeniería química y medicina ANEXO C y E.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

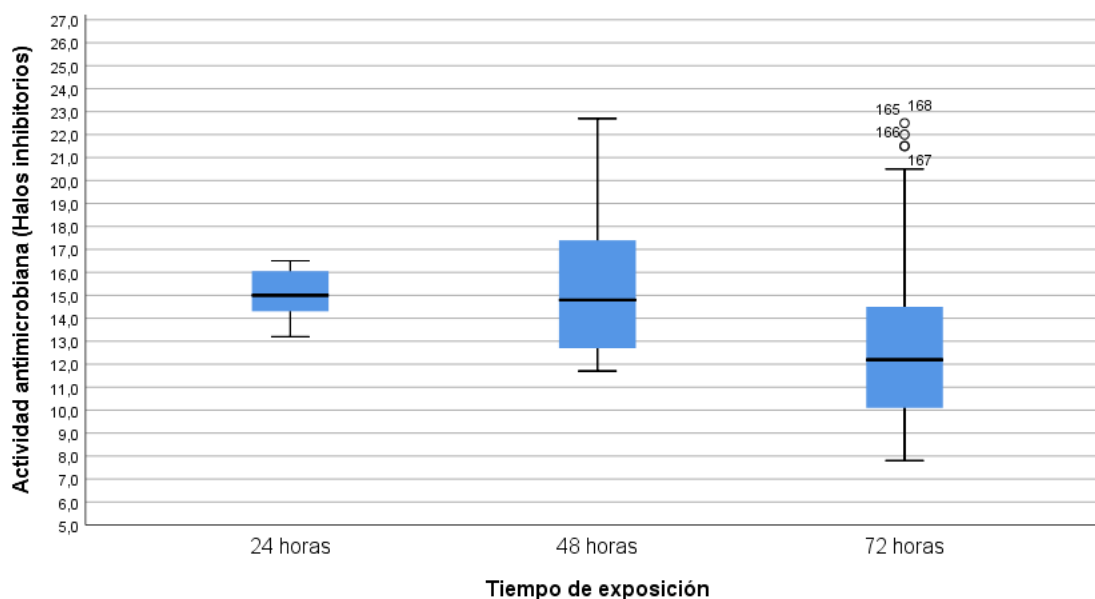
4.1. RESULTADOS

TABLA N° 1.- Actividad antibacteriana en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Calendula officinalis* a las 24, 48 y 72 horas.

N=120	Tiempo	24 horas	P valor	48 horas	P valor	72 horas
	Media	15,03	0,44	15,37	0,00	12,74
	Mediana	15,00		14,80		12,20
	Moda	14,50		15,00		13,80
	Desviación estándar	1,02		3,15		3,64
	Varianza	1,04		9,94		13,25
	Rango	3,30		11,00		14,70
	Mínimo	13,20		11,70		7,80
	Máximo	16,50		22,70		22,50
	Agua destilada	0,00		0,00		0,00
	P valor K-W	0,00		0,00		0,00

Fuente: Base de datos

FIGURA N° 1.- Actividad antibacteriana en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Calendula officinalis* a las 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Base de datos

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 1 y figura N° 1 se observa el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Calendula officinalis*, a las 24 horas tiene una media de halo de inhibición de 15mm y la mediana es de 15mm, el valor más frecuente, moda, fue de 14,5mm, los valores se desvían de la media en 1,02mm y los datos tienen una varianza de 1,04mm, el rango entre el valor máximo y mínimo de los halos de inhibición es de 3,3mm y el valor máximo es de 16,5mm y el mínimo de 13,2mm.

El efecto antimicrobiano a las 48 horas tiene valores similares en media mediana y moda, sin embargo, sus datos son más dispersos que el de 24 horas también tiene el mayor valor en halo de inhibición con 22,7mm y su menor valor fue de 11,7mm.

El efecto antimicrobiano a las 72 horas tiene valores disminuidos con respecto a las 24 horas y 48 horas en cuanto a sus medidas de tendencia central, sus datos son más dispersos y tiene la mayor varianza 13,25 en comparación con las otras, también presenta 3 valores atípicos muy grandes en 4 casos, su valor máximo de inhibición es de 22,5mm siendo este menor al de 48 horas y mayor al de 24 horas y su valor mínimo es de 7,8mm.

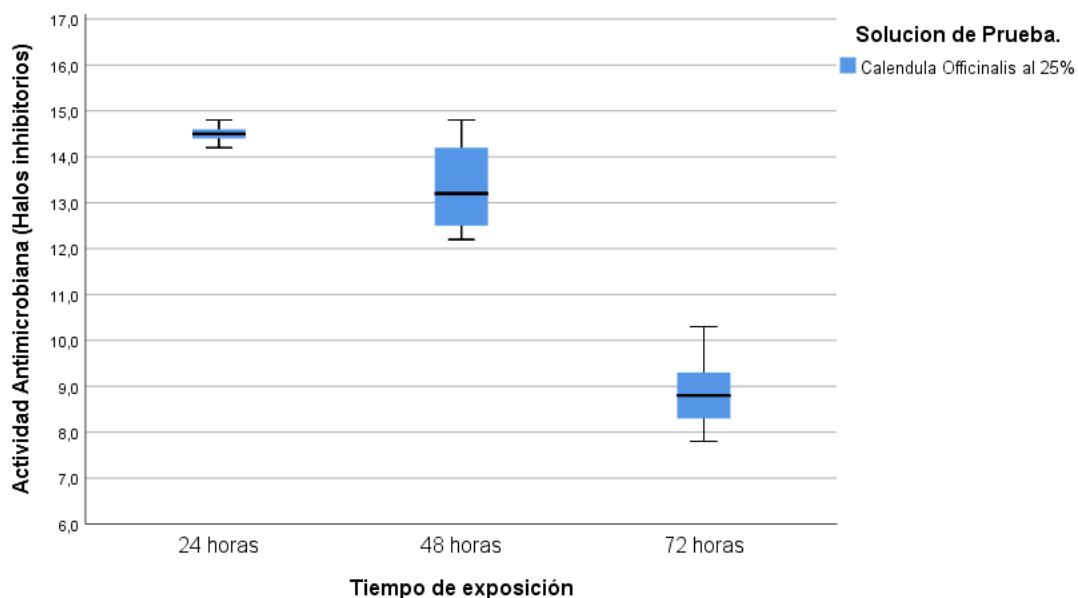
Entonces, si existe actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la *Calendula officinalis* sea a las 24, 48 y 72 horas en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis, así también la media de la actividad antimicrobiana a las 24 horas es ligeramente menor que a la de 48 horas sin embargo no existen diferencias estadísticamente significativas $p=0,44$ y la media de la actividad antimicrobiana a las 48 horas es mayor que a las 72 horas con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, todo esto evaluado con la prueba de Wilcoxon, siendo el efecto a las 24 y 48 horas similares y mayores que en 72 horas.

TABLA N° 2.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 25% en 24, 48 y 72 horas.

N=30	Tiempo	24 horas	P valor	48 horas	P valor	72 horas
	Media	14,51	0,00	13,44	0,00	8,88
	Mediana	14,50		13,20		8,80
	Moda	14,50		12,20		8,30
	Desviación estándar	0,16		0,97		0,66
	Varianza	0,03		0,95		0,44
	Rango	0,60		2,60		2,50
	Mínimo	14,20		12,20		7,80
	Máximo	14,80		14,80		10,30
	Agua destilada	0,00		0,00		0,00
	P valor K-W	0,00		0,00		0,00

Fuente: Base de datos

FIGURA N° 2.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 25% en 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N° 2 y Figura N° 2 se observa el halo inhibitorio del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 25%, a las 24 horas tiene una media de halo de inhibición de 14,5 mm, la mediana y moda también tienen 14,5mm, los valores son uniformes, el rango entre el valor máximo y mínimo de los halos de inhibición es de 0.6mm, el valor mínimo es de 14,2mm y el máximo de 14,8mm.

A las 48 horas los valores de tendencia central son menores en 1mm aproximadamente, también sus datos son más dispersos que el de 24 horas, tiene un valor máximo similar al de 24 horas 14,8 mm y un valor mínimo de 12,2mm evidenciando un inicio en la disminución del efecto antibacteriano.

El efecto antimicrobiano a las 72 horas tiene valores aún más bajos con respecto a las 24 y 48 horas, sus valores son menos dispersos que el de 48 horas, y se evidencia una alta disminución del efecto antibacteriano, con un valor mínimo de 7,8mm y valor máximo de 10,30.

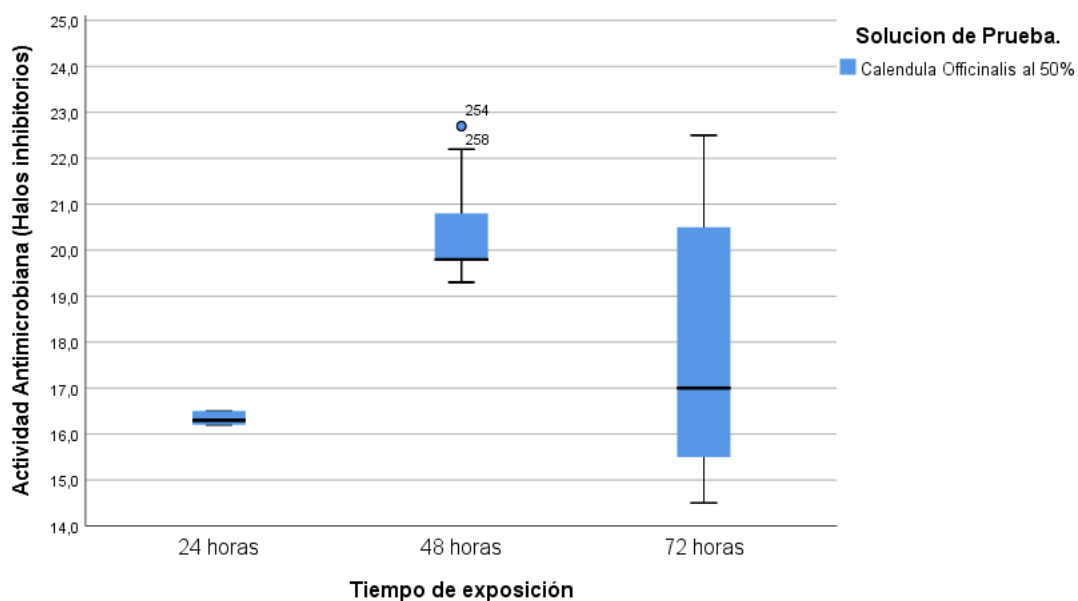
Entonces, si existe actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *la Calendula officinalis* al 25% sea a las 24, 48 y 72 horas en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis, así también la media de la actividad antimicrobiana a las 24 horas es mayor que a la de 48 horas con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ y la media de la actividad antimicrobiana a las 48 horas es mayor que a las 72 horas también con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, todo esto evaluado con la prueba de Wilcoxon, siendo así el mayor efecto antibacteriano a las 24 horas y el menor a las 72 horas.

TABLA N° 3.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 50% en 24, 48 y 72 horas.

N=30	Tiempo	24 horas	P valor	48 horas	P valor	72 horas
	Media	16,33	0,00	20,40	0,00	17,83
	Mediana	16,30		19,80		17,00
	Moda	16,30		19,80		15,50
	Desviación estándar	0,12		1,03		2,39
	Varianza	0,01		1,07		5,70
	Rango	0,30		3,40		8,00
	Mínimo	16,20		19,30		14,50
	Máximo	16,50		22,70		22,50
	Agua destilada	0,00		0,00		0,00
	P valor K-W	0,00		0,00		0,00

Fuente: Base de datos

FIGURA N° 3.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Caléndula Officinalis* al 50% en 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 3 y Figura N° 3 se observa el halo inhibitorio del extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50%, a las 24 horas tiene una media de halo de inhibición de 16,3 mm, la mediana y moda también tienen 16,3mm, los valores son uniformes, el rango entre el valor máximo y mínimo de los halos de inhibición es de 0,3mm y el valor mínimo es de 16,2mm y el máximo de 16,5mm.

A las 48 horas los valores de tendencia central son mayores en 4mm aproximadamente, sus valores son más dispersos que el de 24 horas, también presenta 1 valor atípico muy grande en 2 casos, tiene un valor máximo de 22,7mm y mínimo de 19,3mm, superior al de 24 horas, evidenciando un aumento en la actividad antimicrobiana.

El efecto antimicrobiano a las 72 horas tiene valores más altos que en 24 horas, pero menores que en 48 horas, sus datos son más dispersos que en 24 horas y 48 horas, y se evidencia una disminución del efecto antibacteriano, con un valor mínimo de 14,5mm y valor máximo de 22,5mm.

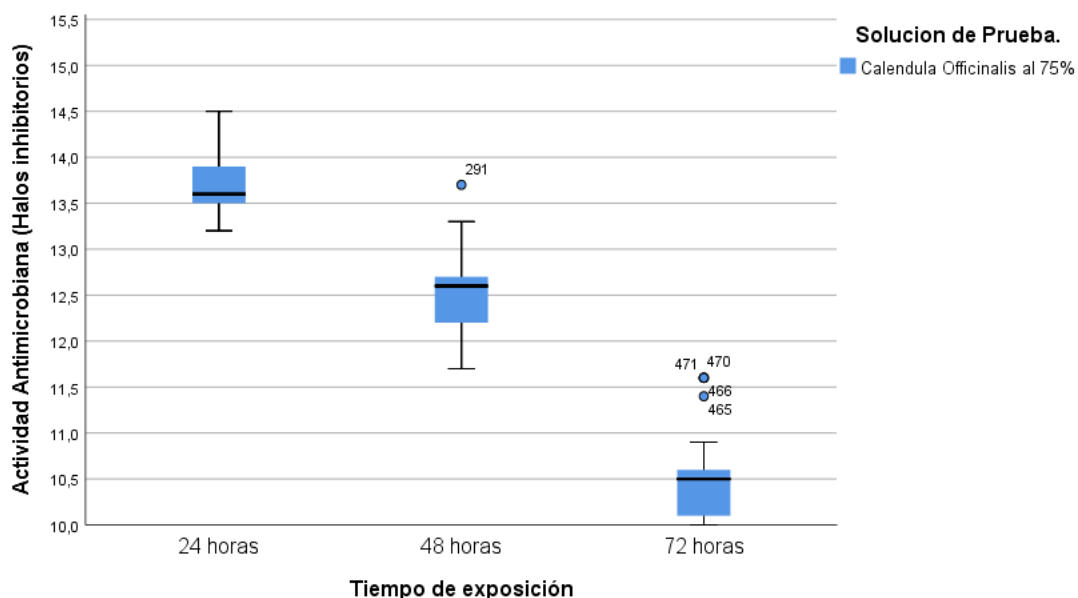
Entonces, si existe actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la *Calendula officinalis* al 50% sea a las 24, 48 y 72 horas en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis, así también la media de la actividad antimicrobiana a las 24 horas es menor que a la de 48 horas con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ y la media de la actividad antimicrobiana a las 48 horas es mayor que a las 72 horas también con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, todo esto evaluado con la prueba de Wilcoxon, siendo así el mayor efecto antibacteriano a las 48 horas y el menor a las 24 horas.

TABLA N° 4.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 75% en 24, 48 y 72 horas.

N=30	Tiempo	24 horas	P valor	48 horas	P valor	72 horas
	Media	13,74	0,00	12,53	0,00	10,61
	Mediana	13,60		12,60		10,50
	Moda	13,60		12,20		10,50
	Desviación estándar	0,39		0,53		0,49
	Varianza	0,15		0,29		0,24
	Rango	1,30		2,00		1,60
	Mínimo	13,20		11,70		10,00
	Máximo	14,50		13,70		11,60
	Agua destilada	0,00		0,00		0,00
	P valor K-W	0,00		0,00		0,00

Fuente: Base de datos.

FIGURA N° 4.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 75% en 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 4 y Figura N° 4 se observa el halo inhibitorio del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 75%, a las 24 horas tiene una media de halo de inhibición de 13,7 mm, la mediana y moda tienen 13,6mm, los valores son uniformes, el rango entre el valor máximo y mínimo de los halos de inhibición es de 1,3mm y el valor mínimo es de 13,2mm y el máximo de 14,5mm.

A las 48 horas los valores de tendencia central son menores en 1mm aproximadamente, sus datos son ligeramente más dispersos que el de 24 horas, también presenta 1 valor atípico muy grande en 1 caso, tiene un valor máximo de 13,7mm y mínimo de 11,7mm inferior al de 24 horas, evidenciando una disminución en la actividad antimicrobiana.

El efecto antimicrobiano a las 72 horas tiene los valores más bajos, sus datos tienen parecida dispersión al de 48 horas, también presenta 2 valores atípicos muy grandes en 4 casos, se evidencia una disminución del efecto antibacteriano, con un valor mínimo de 10mm y valor máximo de 11,6mm.

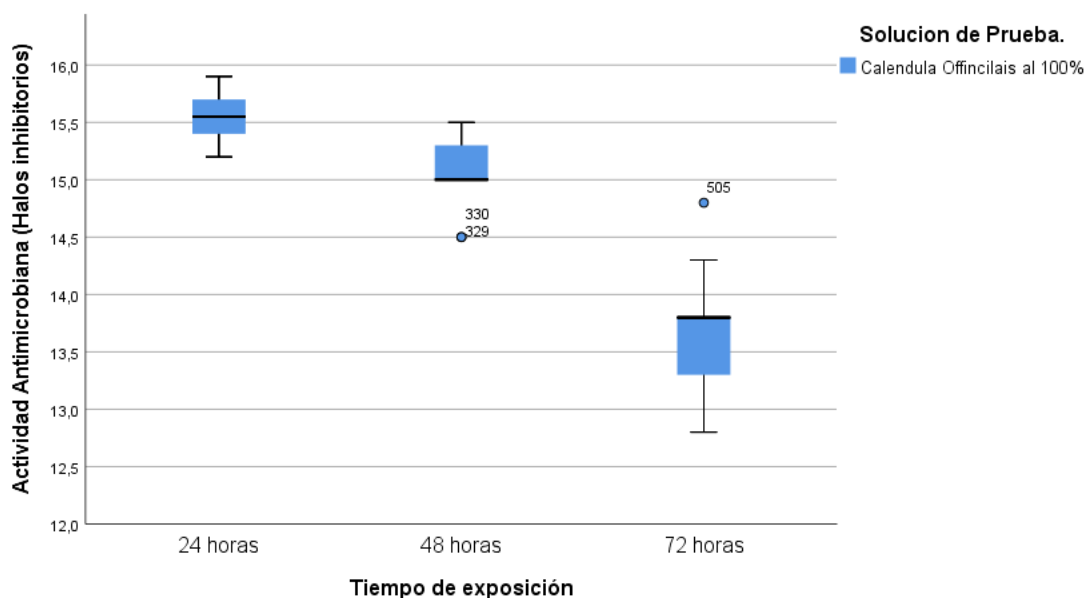
Entonces, si existe actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la *Caléndula officinalis* al 75% sea a las 24, 48 y 72 horas en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis, así también la media de la actividad antimicrobiana a las 24 horas es mayor que a la de 48 horas con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ y la media de la actividad antimicrobiana a las 48 horas es mayor que a las 72 horas también con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, todo esto evaluado con la prueba de Wilcoxon, siendo así el mayor efecto antibacteriano a las 24 horas y el menor a las 72 horas.

TABLA N° 5.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 100% en 24, 48 y 72 horas.

N=30	Tiempo	24 horas	P valor	48 horas	P valor	72 horas
	Media	15,54	0,00	15,11	0,00	13,63
	Mediana	15,55		15,00		13,80
	Moda	15,60		15,00		13,80
	Desviación estándar	0,19		0,27		0,43
	Varianza	0,04		0,07		0,19
	Rango	0,70		1,00		2,00
	Mínimo	15,20		14,50		12,80
	Máximo	15,90		15,50		14,80
	Agua destilada	0,00		0,00		0,00
	P valor K-W	0,00		0,00		0,00

Fuente: Base de datos

FIGURA N° 5.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 100% en 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 5 y Figura N° 5 se observa el halo inhibitorio del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* al 100%, a las 24 horas tiene una media de halo de inhibición de 15,54 mm, la mediana y moda tienen 15,6mm, los valores son uniformes, el rango entre el valor máximo y mínimo de los halos de inhibición es de 0,7mm y el valor mínimo es de 15,2mm y el máximo de 15,9mm.

A las 48 horas los valores de tendencia central son menores en 0,5mm aproximadamente, sus datos son ligeramente más dispersos que el de 24 horas, también presenta 1 valor atípico muy pequeño en 2 casos, tiene un valor máximo de 14,5mm y mínimo de 15,5mm inferior al de 24 horas, así evidenciando una ligera disminución en la actividad antimicrobiana.

El efecto antimicrobiano a las 72 horas tiene los valores más bajos, sus datos tienen la mayor dispersión, también presenta 1 valor atípico en 1 único caso, se evidencia una disminución del efecto antibacteriano, con un valor mínimo de 12,8mm y valor máximo de 14,8mm.

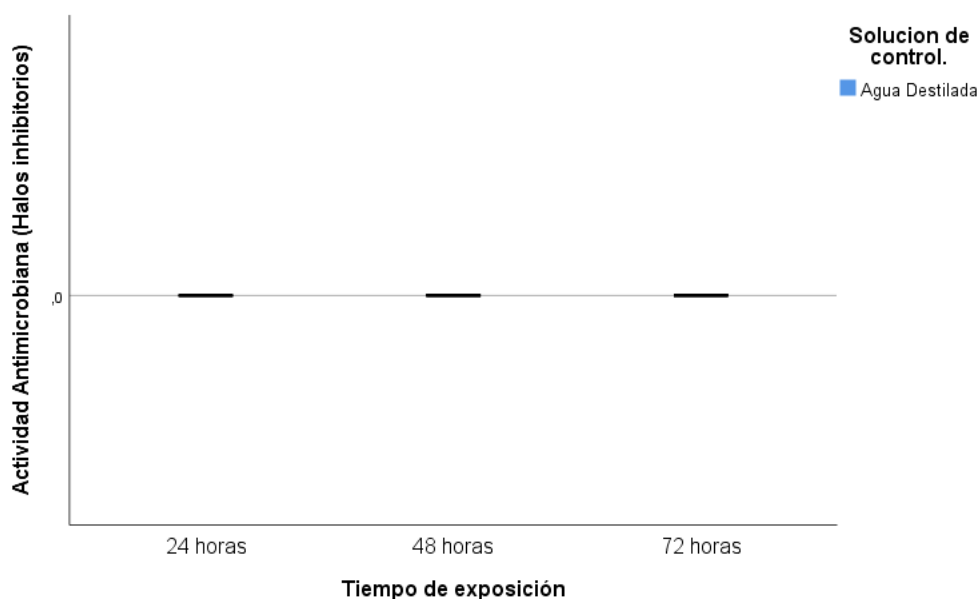
Entonces, si existe actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la *Caléndula officinalis* al 100% sea a las 24, 48 y 72 horas en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis, así también la media de la actividad antimicrobiana a las 24 horas es mayor que a la de 48 horas con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ y la media de la actividad antimicrobiana a las 48 horas es mayor que a las 72 horas también con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, todo esto evaluado con la prueba de Wilcoxon, siendo así el mayor efecto antibacteriano a las 24 horas y el menor a las 72 horas.

TABLA N° 6.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del agua destilada (control negativo) en 24, 48 y 72 horas.

N=30	Tiempo	24 horas	P valor	48 horas	P valor	72 horas
	Media	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
	Mediana	0,00		0,00		0,00
	Moda	0,00		0,00		0,00
	Desviación estándar	0,00		0,00		0,00
	Varianza	0,00		0,00		0,00
	Rango	0,00		0,00		0,00
	Mínimo	0,00		0,00		0,00
	Máximo	0,00		0,00		0,00

Fuente: Base de datos

FIGURA N° 6.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) del agua destilada (control negativo) en 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

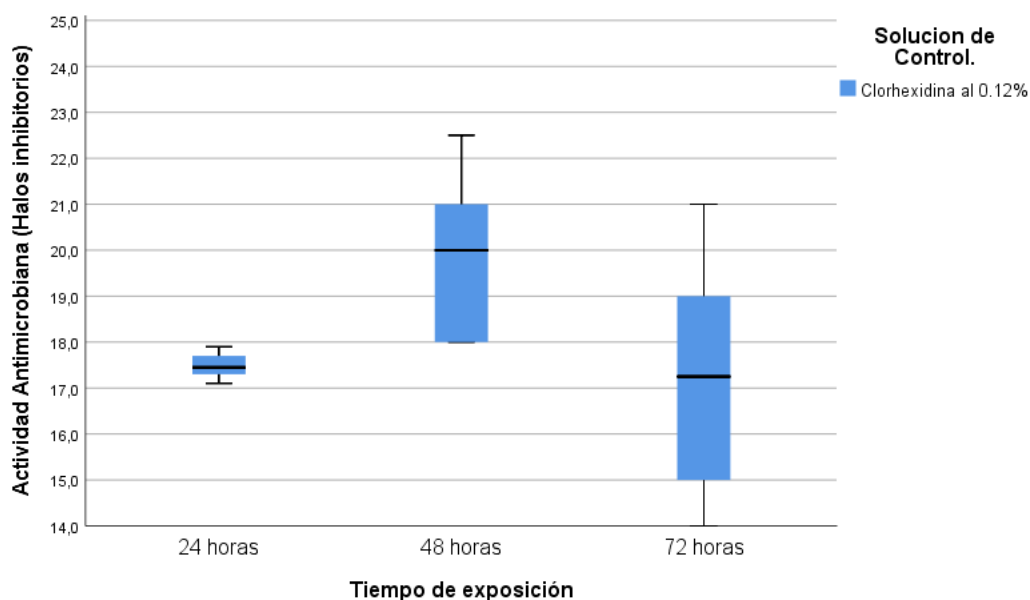
En la tabla N° 6 y Figura N° 6 se observa el tamaño del halo inhibitorio del agua destilada (control negativo), en todas las pruebas realizadas no tuvo ningún efecto, a las 24, 48 y 72 horas, sirvió de contraste para evaluar la actividad antimicrobiana de la *Caléndula officinalis* y la clorhexidina al 0,12% (control positivo), así también sus valores no tuvieron ninguna diferencia estadísticamente significativa $p=1,00$, evaluado con la prueba de Wilcoxon.

TABLA N° 7.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) de la Clorhexidina al 0.12% (control positivo) en 24, 48 y 72 horas.

N=30	Tiempo	24 horas	P valor	48 horas	P valor	72 horas
	Media	17,48	0,00	19,68	0,00	17,13
	Mediana	17,45		20,00		17,25
	Moda	17,40		18,00		19,00
	Desviación estándar	0,24		1,63		2,42
	Varianza	0,06		2,65		5,86
	Rango	0,80		4,50		7,00
	Mínimo	17,10		18,00		14,00
	Máximo	17,90		22,50		21,00
	Agua destilada	0,00		0,00		0,00
	P valor K-W	0,00		0,00		0,00

Fuente: Base de datos.

FIGURA N° 7.- Halo inhibitorio en milímetros (mm) de la Clorhexidina al 0.12% (control positivo) en 24, 48 y 72 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 7 y Figura N° 7 se observa el halo inhibitorio de la clorhexidina al 0.12%, a las 24 horas tiene una media de halo de inhibición de 17,48 mm, la mediana y moda son de 17,45mm y 17,4mm respectivamente, los valores son uniformes, el rango entre el valor máximo y mínimo de los halos de inhibición es de 0.8mm y el valor mínimo es de 17,1mm y el máximo de 17,9mm.

A las 48 horas los valores de tendencia central aumentaron de 1mm a 3mm aproximadamente y son los más altos, sus valores son más dispersos, tiene un valor máximo de 22,5mm y mínimo de 18mm mayor al de 24 horas, mostrando un aumento en la actividad antimicrobiana.

El efecto antimicrobiano a las 72 horas tiene sus medidas de tendencia central más bajas que el de 48 horas y 24 horas, excepto en el valor más frecuente, moda, que fue de 19mm, tiene una mayor dispersión, y se evidencia una disminución del efecto antibacteriano, con un valor mínimo de 14mm y máximo de 21mm.

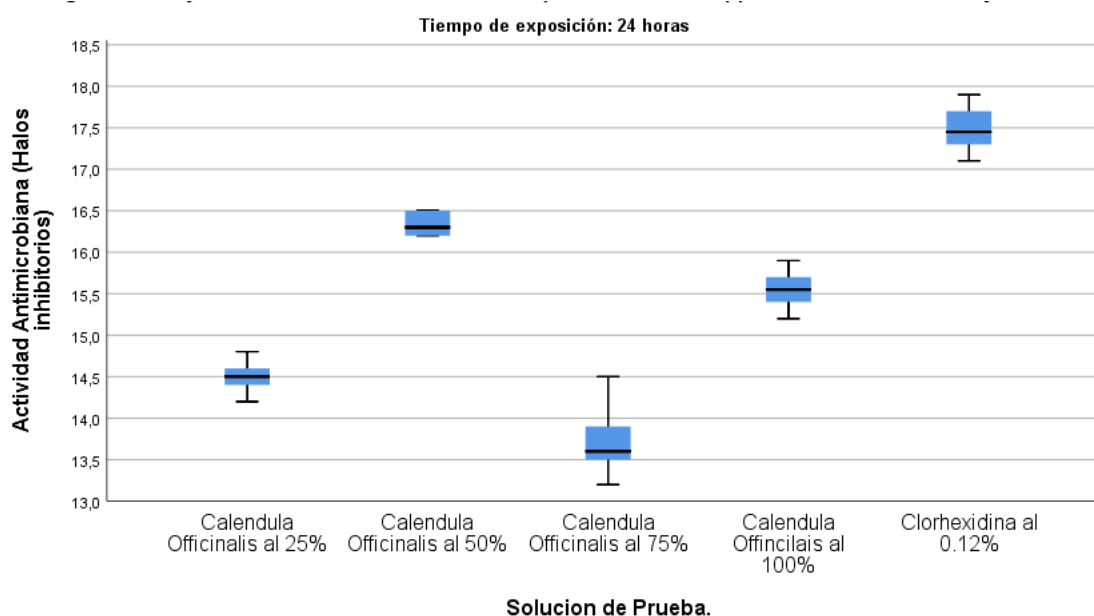
Entonces, si existe actividad antimicrobiana de la Clorhexidina al 0.12% sobre las cepas de *Streptococcus mutans* sea a las 24, 48 y 72 horas en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis, así también la media de la actividad antimicrobiana a las 24 horas es menor que a la de 48 horas con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$ y la media de la actividad antimicrobiana a las 48 horas es mayor que a las 72 horas también con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, todo esto evaluado con la prueba de Wilcoxon, siendo así el mayor efecto antibacteriano a las 48 horas y el menor a las 72 horas.

TABLA N° 8.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 24 horas.

Solución de Prueba y control.	Media	N	Desviación Estándar	Varianza	Mínimo	Máximo	P valor K-W
Agua Destilada	0,00	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Calendula Officinalis al 25%	14,51	30	0,16	0,03	14,20	14,80	0,00
Calendula Officinalis al 50%	16,33	30	0,12	0,01	16,20	16,50	0,00
Calendula Officinalis al 75%	13,74	30	0,39	0,15	13,20	14,50	0,00
Calendula Officinalis al 100%	15,54	30	0,19	0,04	15,20	15,90	0,00
Clorhexidina al 0.12%	17,48	30	0,24	0,06	17,10	17,90	0,00
Calendula Officinalis al 50%	16,33	30	0,12	0,01	16,20	16,50	0,00
Clorhexidina al 0.12%	17,48	30	0,24	0,06	17,10	17,90	0,00
P valor M-W	0,00						

Fuente: Base de datos.

FIGURA N° 8.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 24 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 8 y Figura N° 8 se observa la comparación del halo inhibitorio de las soluciones de prueba y control, el valor de la media más alta es de la clorhexidina al 0.12% con 17,48mm seguido del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* al 50% con 16,33mm, que tiene el menor rango de valores y la menor dispersión, el extracto etanólico al 75% tiene la media más baja de 13,74mm y con datos menos uniformes, incluso superado por el extracto etanólico al 25% con 14,51mm, sin embargo el extracto etanólico al 100% presenta una mayor media de 15,54mm con respecto a estas dos últimas, siendo así el mayor halo de inhibición de 17,9mm y el menor de 13.2mm, todo esto evaluado en 24 horas.

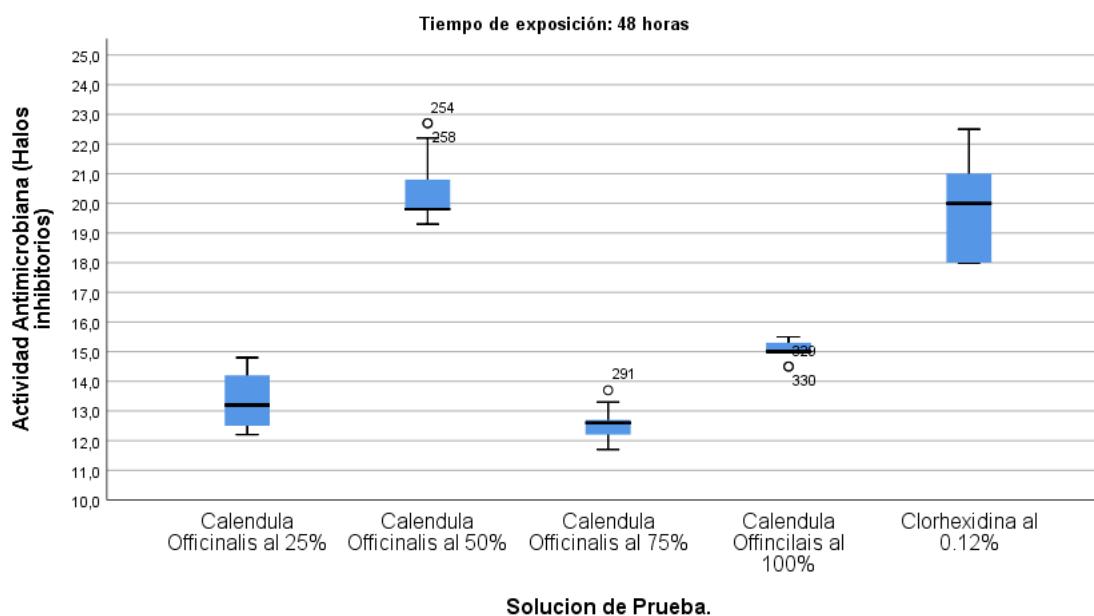
Entonces, si existe actividad antimicrobiana de las soluciones de prueba y control positivo sobre las cepas de *Streptococcus mutans* en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, así también la clorhexidina al 0.12% tiene mayor efecto inhibitorio mientras que el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 75% tiene el menor, sin embargo el extracto etanólico al 100% es mejor que las concentraciones de 25 y 75% y la concentración de 50% es mejor que la concentración del 100%, es decir la mejor de las soluciones de prueba, todo esto evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, sin embargo por la proximidad de los datos se comparó más específicamente el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50% con la clorhexidina al 0.12% donde $p=0.00$ demostrando diferencias estadísticamente significativas e indicando que la clorhexidina al 0.12% es más efectiva que el extracto etanólico al 50% en las 24 horas, esto realizado con la prueba U de Mann-Whitney.

TABLA N° 9.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 48 horas.

Solución de Prueba y control.	Media	N	Desviación Estándar	Varianza	Mínimo	Máximo	P valor K-W
Agua Destilada	0,00	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Calendula Officinalis al 25%	13,44	30	0,97	0,95	12,20	14,80	0,00
Calendula Officinalis al 50%	20,40	30	1,03	1,07	19,30	22,70	0,00
Calendula Officinalis al 75%	12,53	30	0,53	0,29	11,70	13,70	0,00
Calendula Officinalis al 100%	15,11	30	0,27	0,07	14,50	15,50	0,00
Clorhexidina al 0.12%	19,68	30	1,63	2,65	18,00	22,50	0,00
Calendula Officinalis al 50%	20,40	30	1,03	1,07	19,30	22,70	0,00
Clorhexidina al 0.12%	19,68	30	1,63	2,65	18,00	22,50	0,00
P valor M-W	0,21						

Fuente: Base de datos.

FIGURA N° 9.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 48 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 9 y Figura N° 9 se observa la comparación del halo inhibitorio de las soluciones de prueba y control, el valor de la media más alta es del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* al 50% con 20,40mm seguido de la clorhexidina al 0.12% con 19,68mm, que tiene los valores menos uniformes, el extracto etanólico al 75% tiene la media más baja de 12,53mm, incluso superado por el extracto etanólico al 25% con 13,44mm, sin embargo el extracto etanólico al 100% presenta una mayor media de 15,11mm con respecto a estas dos últimas, también tiene el menor rango de valores y la menor dispersión, siendo así el mayor halo de inhibición de 22,7mm y el menor de 11,7mm, todo esto evaluado en 48 horas.

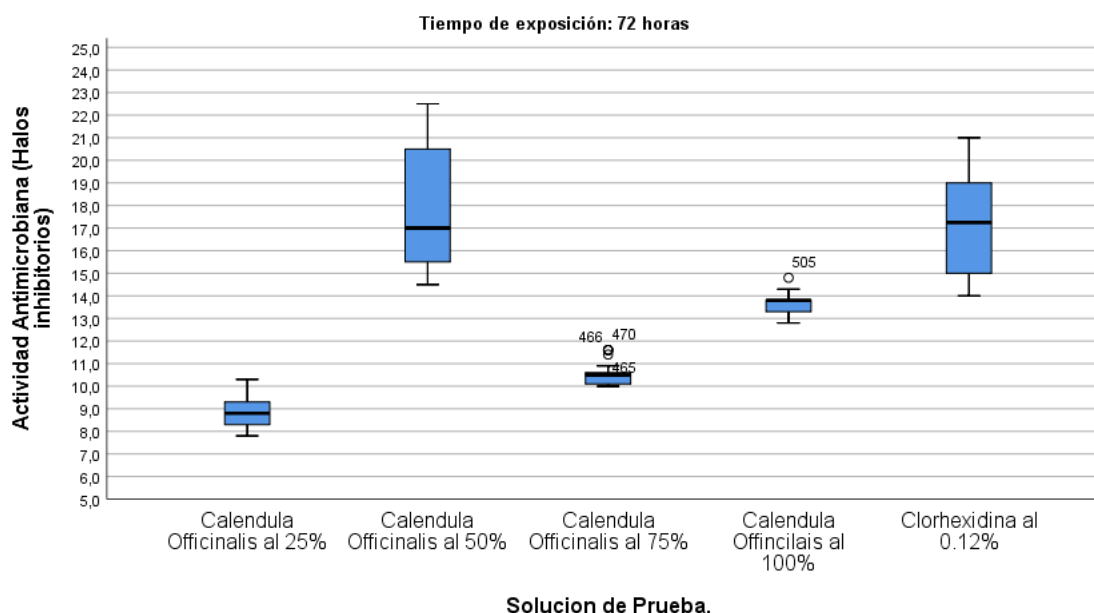
Entonces, si existe actividad antimicrobiana de las soluciones de prueba y control positivo sobre las cepas de *Streptococcus mutans* en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, así también el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50% tiene mayor efecto inhibitorio mientras que el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 75% tiene el menor, sin embargo el extracto etanólico al 100% es mejor que las concentraciones de 25 y 75% y la clorhexidina al 0.12% es mejor que la concentración del 100%, todo esto evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, sin embargo por la proximidad de los datos se comparó más específicamente el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50% con la clorhexidina al 0.12% donde $p=0.21$ demostrando que no hay diferencias estadísticamente significativas e indicando que la clorhexidina al 0.12% tiene el mismo efecto que el extracto etanólico al 50% en las 48 horas, esto realizado con la prueba U de Mann-Whitney.

TABLA N° 10.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 72 horas.

Solución de Prueba y control.	Media	N	Desviación Estándar	Varianza	Mínimo	Máximo	P valor K-W
Agua Destilada	0,00	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Calendula Officinalis al 25%	8,88	30	0,66	0,44	7,80	10,30	0,00
Calendula Officinalis al 50%	17,83	30	2,39	5,70	14,50	22,50	0,00
Calendula Officinalis al 75%	10,61	30	0,49	0,24	10,00	11,60	0,00
Calendula Officinalis al 100%	13,63	30	0,43	0,19	12,80	14,80	0,00
Clorhexidina al 0.12%	17,13	30	2,42	5,86	14,00	21,00	0,00
Calendula Officinalis al 50%	17,83	30	2,39	5,70	14,50	22,50	0,00
Clorhexidina al 0.12%	17,13	30	2,42	5,86	14,00	21,00	0,00
P valor M-W	0,18						

Fuente: Base de datos.

FIGURA N° 10.- Comparación de halos inhibitorios en milímetros (mm) de las soluciones de prueba y control en 72 horas.



Fuente: Base de datos.

INTERPRETACIÓN:

En la tabla N° 10 y Figura N° 10 se observa la comparación del halo inhibitorio de las soluciones de prueba y control, el valor de la media más alta es del extracto etanólico de *Calendula Officinalis* al 50% con 17,83mm, caracterizado también por un mayor rango de valores, seguido de la clorhexidina al 0.12% con 17,13mm, que tiene los valores más dispersos, el extracto etanólico al 25% tiene la media más baja de 8,88mm, superado por el extracto etanólico al 75% con 10,61mm, sin embargo el extracto etanólico al 100% presenta una mayor media de 13,63mm con respecto a estas dos últimas, también tiene la menor dispersión, siendo así el mayor halo de inhibición de 20,50mm y el menor de 7,80mm, todo esto evaluado en 72 horas.

Entonces, si existe actividad antimicrobiana de las soluciones de prueba y control positivo sobre las cepas de *Streptococcus mutans* en contraste con el control negativo, con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, así también el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50% tiene mayor efecto inhibitorio mientras que el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 25% tiene el menor, sin embargo el extracto etanólico al 100% es mejor que las concentraciones de 25 y 75%, pero la concentración de 75% es mejor que la de 25% y la clorhexidina al 0.12% es mejor que la concentración del 100%, todo esto evaluado con la prueba H de Kruskal-Wallis con diferencias estadísticamente significativas $p=0,00$, sin embargo por la proximidad de los datos se comparó más específicamente el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50% con la clorhexidina al 0.12% donde $p=0.18$ demostrando que no hay diferencias estadísticamente significativas e indicando que la clorhexidina al 0.12% tiene el mismo efecto que el extracto etanólico al 50% en las 72 horas, esto realizado con la prueba U de Mann-Whitney.

4.2. DISCUSIÓN

La investigación fue aplicativa, prospectiva, transversal y experimental de diseño cuasiexperimental, tuvo como propósito determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de la *Calendula officinalis L.* en *Streptococcus mutans*, utilizando 4 concentraciones diferentes de 25%, 50%, 75% y 100%, usando de control de contraste la clorhexidina al 0,12% y agua destilada, todos evaluados en los tiempos de 24, 48 y 72 horas.

A partir de los hallazgos encontrados se acepta la hipótesis planteada que indica la existencia de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Caléndula officinalis L.* en *Streptococcus mutans* en la ciudad de Puno.

Estos resultados guardan relación con Maji S. Et al. (24) quienes realizaron una investigación similar, excepto que usaron digluconato de clorhexidina al 0.2% como control positivo, en su trabajo se muestran mediciones de los halos inhibitorios realizados con una cantidad de 50ul de *Caléndula officinalis* y digluconato de clorhexidina y se obtuvieron 15mm y 20 mm de halo de inhibición respectivamente, en comparación con nuestros resultados se observa valores similares en la Tabla N° 1 con referencia a la *Caléndula officinalis en general* y en cuanto a la clorhexidina en la Tabla N° 7 se obtuvo un menor halo de inhibición podría ser por la concentración menor con la que se trabajó, que es la clorhexidina al 0.12% , con 17, 4mm y 19,6 mm de halo de inhibición a las 24 horas y 48 horas respectivamente.

Giorgi J. *et al.* (23) mostraron que la *Caléndula officinalis* tiene resultados positivos, tomando en cuenta que a mayor dosificación (cantidad) mayor inhibición bacteriana, sin embargo, haciendo una comparación entre el estudio de Maji S. *et al.* (24) y la investigación realizada, existe una diferencia en la cantidad de soluciones usadas siendo esta de 50ul y 10ul en esta investigación, por lo cual, analizando los datos obtenidos, no existen muchas diferencias a excepción del halo de inhibición del digluconato de clorhexidina al 0.2%, que es mayor, pero se le atribuyo su mayor halo de inhibición debido a su alta concentración, entonces se podría negar la afirmación de a mayor dosificación mayor inhibición bacteriana, aun así la investigación de Giorgi J. *et al.* (23) fue evaluada de forma diferente, por espectrofotometría, y viendo sus resultados se afirma que la *Calendula officinalis* tiene efecto inhibitorio en las cepas de *Streptococcus mutans*, por lo cual apoya a nuestra hipótesis planteada.

También en el estudio realizado por Manrique L. (28) evalúa la *Caléndula officinalis* al 20% y 15% donde se hace evidencia de que la efectividad de la clorhexidina al 0.12% frente a estas concentraciones es mayor, lo cual no concuerda del todo con la investigación realizada, según la Tabla N° 8, 9 y 10, donde se ve que el efecto de la clorhexidina al 0.12 % solo es mayor en las 24 horas, en las 48 horas es menor comparado con extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50% y en 72 horas sus efectos son similares $p=0.332$ según la prueba de Wilcoxon.

La *Calendula officinalis* al 100% y 75% no fueron tan efectivas a las 24 horas, sobre todo en la concentración de 75% en las primeras 24 horas, lo cual nos indicaría que el efecto antibacteriano no está relacionado del todo con la concentración, como es evidenciado en el estudio de Ferreira J. *et al.* (25) donde se tiene resultados similares en cuanto al halo de inhibición de la clorhexidina al 0.12% , pero valores menores en cuanto al Extracto de *Calendula officinalis*, aun así se describe que mientras más diluido estaba el extracto menos efecto inhibitorio presentaba, sin embargo existen otros factores que no se consideraron en la presente investigación, que pudieron afectar en los resultados, entre ellos el lugar, tiempo de siembra y forma de cultivo de la planta, según Russo F. *et al.* (26) todos esos factores están muy relacionados con la cantidad de flavonoides en la planta, que está asociada a la actividad antimicrobiana de esta, por lo cual, para evaluar la cantidad de flavonoides en la planta era necesaria un estudio fitoquímico completo que no se logró realizar como fue realizado en el estudio de Manrique L. (28), también influye el método de extracción de principios activos, según Amaguaña F. y Churuchumbi E. (56) el mejor método de extracción es el de percolación en comparación con la maceración, pero la percolación es mucho más compleja, no se pudo optar por ese método así que se realizó el método de maceración al frio; la filtración es otro factor que se pudo realizar evaporando por completo el medio de solución mediante el método de filtración al vacío como se indica en el estudio de Agudelo C. (27), obteniendo un polvo concentrado del principio activo en cuestión, sin embargo se realizó la filtración por gravedad como se indica en la investigación de Manrique L. (28), todos estos métodos, de haberse aplicado, nos pudieron haber permitido determinar una concentración real y adecuada como se indica en la Farmacopea Brasileña (57) que tiene una presentación estandarizada de la *Calendula officinalis*, así también otro factor importante es la homogeneidad del extracto etanólico, donde la agitaciones fueron esporádicas y manuales para esta investigación, a diferencia con el estudio de Manrique L. (28) que realizo agitaciones periódicas 870 veces

cada 12 horas, lo cual tampoco se logró por el acceso al laboratorio, también se plantea la teoría de la saturación de los principios activos en la solución, suponiendo que al estar en proporciones iguales podría existir una mayor difusión y en concentraciones altas podría no haber una buena difusión en el medio de cultivo, poniendo a la concentración de 50% y 25% como las más adecuadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la *Calendula officinalis L.*, todo esto pudo alterar e influir en los resultados encontrados, sin embargo se necesitarían más evidencia para ponerlas en claro, lo cual nos motiva a realizar más estudios acerca de esta planta en nuestra región.

V. CONCLUSIONES

1. Si existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de la *Calendula officinalis* L. frente a las cepas de *Streptococcus mutans* en la ciudad de Puno-2019, con efectos similares dentro de las 24 y 48 horas y efectos reducidos en las 72 horas.
2. El tamaño del halo inhibitorio de la *Calendula officinalis* al 25%, fue mejor a las 24 horas, pero su actividad antimicrobiana baja bruscamente hasta las 72 horas, en cambio la concentración del 50% tiene su mayor efecto a las 48 horas, habiendo un incremento de 24 a 48 horas y una reducción a las 72 horas, además tuvo el mayor efecto frente a las demás concentraciones en las 24, 48 y 72 horas, también la concentración de 75% tuvo su mejor efecto a las 24 horas, pero su actividad antimicrobiana baja hasta las 72 horas, además es el menos efectivo en las 24 horas, pero mayor que la concentración de 25% a las 48 y 72 horas; en la concentración de 100% también tiene su mejor efecto a las 24 horas, con una reducción de su actividad antimicrobiana hasta las 72 horas, pero es mejor que las concentraciones de 25% y 75% en las 24, 48 y 72 horas.
3. El tamaño del halo inhibitorio en el grupo control con agua destilada en *Streptococcus mutans* fue nulo en las 24, 48 y 72 horas.
4. El tamaño del halo inhibitorio en el grupo control con clorhexidina al 0.12% en *Streptococcus mutans* fue mejor a las 48 horas, así que hubo un incremento del halo inhibitorio de 24 a 48 horas y una reducción del efecto a las 72 horas.
5. El tamaño del halo inhibitorio del extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 25%, 50%, 75% y 100% fue mayor al del control negativo (agua destilada) por lo tanto si presentan efecto inhibitorio sobre las cepas de *Streptococcus mutans* en 24, 48 y 72 horas; el extracto etanólico de la *Calendula officinalis* al 50% a las 48 y 72 horas tiene un efecto similar al de la clorhexidina al 0.12% (control positivo) y en ambos casos su efecto incrementa y después se reduce; en cambio el extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 25%, 75% y 100% no fueron tan efectivas como la clorhexidina al 0.12% en las 24, 72 y 48 horas.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios experimentales *in vitro* con la *Calendula officinalis L.* en diferentes bacterias patógenas orales para ampliar el espectro de la actividad inhibitoria.
2. Se recomienda realizar trabajos comparativos aplicando los principios activos de la *Calendula officinalis L.* en muchos productos de higiene oral y otros en la región y Latinoamérica.
3. Se recomienda realizar exámenes más profundos como los fitoquímicos, en los compuestos que posee la *Calendula officinalis L.* de Puno.
4. Se recomienda el desecado de la *Calendula officinalis L.* en una estufa con aire recirculado para tener mejores resultados.
5. Se recomienda trabajar con bacterias ATCC y bacterias aisladas de Puno para hacer un contraste global y regional.
6. Se recomienda mejorar el proceso de extracción de principios activos de la *Calendula officinalis* con procedimientos más completos y precisos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organizacion mundial de la salud. Organizacion. [Online].; 2012 [cited 2019 Abril 26]. Available from: <https://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/#>.
2. Mestas Flores EF. Estudio epidemiológico de enfermedades bucales mas prevalentes en escolares de 6 a 16 años del departamento de Puno 2015 - 2016. Tesis. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Escuela profesional de Odontologia; 2016.
3. Vallejos Valencia BA, Marino Espinoza AE. Frecuencia de complicaciones post exodoncia simple. Medigraphic. 2012;(42).
4. Cardentey Garcia J, Gonzales Rodriguez R, Gonzales Garcia X. Uso de la medicina natural y tradicional por especialistas en estomatologia general integral. Revista Electronica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta. 2015 Agosto; 40(8).
5. Guillaume Ramirez V, Ortiz Gomez T, Alvarez Artimez I, Marin Quintero ME. Aplicacion de la medicina natural y tradicional y dificultades para su uso en estomatologia. Revista Cubana de estomatologia. 2017; 54(2).
6. Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. [Online].; 2013 [cited 2019 Mayo 13]. Available from: https://bvs.ins.gob.pe/insprint/CENSI/catalogo_floristico_plantas_medicinales.pdf.
7. Santana Fernandez A, Rey Ferrales Y, Rodriguez Ricardo E, Silvia Colome ME, Rodriguez Hung AM. Aplicación de la Medicina tradicional y natural en las urgencias de protesis estomatologicas. Scielo. 2015; 19(3).
8. Corrales Reyes E, Reyes Perez JJ. Actividad Etnofarmacológica y antimicrobiana de los componentes químicos de las plantas medicinales utilizadas en estomatologia. 16 de abril. 2014 Junio 25; 54(257).
9. Leal Parente LM, Ruy de Souza LJ, Faustino Tresvenzol M, Clare Vinaud M, Realino de Paula J, Neusa Margarida P. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of calendula officinalis L. Growing in Brazil. Hindawi Publishing Corporation. 2011 Octubre 14; 2012(375671).
10. Hernandez Hernandez SE, Castañeda Martinez A, Benitez Valle C, Bernal Perez A, Castañeda Montero JE. Cicatrizacion de tejidos de la cavidad oral pos-extracción del tercer molar, en pacientes tratados con tintura madre de Calendula Officinalis L. Oral. 2009; 10(30).
11. Moradkhani S, Salehi I, Abodolmaleki S, Komaki A. Effect of calendula officinalis hidroalcoholic extract on passive avoidance learnig and memory in streptozotocin - induced diabetic rats. Ancient Science of life. 2015; 34(3).
12. Hernandez Rosas NA, Garcia Zabadua JC, Hernandez Delgado N, Torres Castillo S, Figueroa Arredondo P, Mora Escobedo R. Polyphenols profile, antioxidant capacity, and in vitro cytotoxic effect on human cancer cell lines of a hydro-alcoholic extract from Calendula officinalis L. petals. TIP Revista especializada en ciencias Quimico- Biologicas. 2018 Junio; 21(1).
13. Cristiane Gazim Z, Morales Rezende C, Regina Fraga S, Estivaleti Svidzinski TI, Garcia Cortez DA. Antifungal activity of the essential oil from Calendula officinalis L. (Astaraceae) Growing in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2007 Noviembre; 39(1517-8382).
14. Babae N, Moslemi D, Khalipour M, Vejdani F, Moghadamnia Y, Bijani A, et al. Antioxidant capacity of calendula officinalis flowers extract and prevention of

- radiation induced oropharyngeal mucositis in patients with head and neck cancers: a randomized controlled clinical study. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013; 21(1).
15. Liebana Ureña J. *Microbiología Oral*. Segunda ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
 16. Nelofer J, Khurshid Iqbal A, Riffat J. *Calendula officinalis* - An important Medicinal plant with potential biological properties. *Proc Indian Natm Sci Acad*. 2017 Diciembre; 83(4).
 17. Afnasyeva PV, Kurkina AV, Kurkin VA, Lyamin AV, Zhestkov AV. Determination of antimicrobial activity of extracts of *calendula officinalis* flowers. *Farmacia y farmacologia*. 2016; 4(2).
 18. Parra Molina CR. Efecto inhibitorio de extracto de *calendula officinalis* vs clorhexidina al 2% sobre cepas de *staphylococcus aureus*. Tesis. Quito, Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología; 2017.
 19. Chandurkar P, Murab T, Ahakey N, Tripathi N, Choudhary A. Antimicrobial activity of aqueous, acetone and methanol extracts of *Calendula officinalis* L. (Marigold) flower. *International Journal of Pure Applied Biosciencie*. 2015; 3(2).
 20. Sudhakar Khairnar M, Pawar B, Parashram Marawar P, Mani A. Evaluation of *Calendula officinalis* as an anti-plaque and antigingivitis agent. *Jorunal of Indian Society of Periodontology*. 2013; 17(6).
 21. Reis Lima Md, Lopez P, Martins C, Brito AC, Carneiro C, Goes P. The effect of *Calendula officinalis* on oxidative stress and bone loss in experimental periodontitis. *Frontiers in Physiology*. 2017 Junio; 8(440).
 22. Tambur Z, Cenic Milosevic D, Mileusnic I, Doder R, Marjanovic M, Miljkovic Selimovic B, et al. Inhibitory effects of diferent medicinal plants on *Candida albicans* growth. *Med. Weter*. 2018 marzo; 74(7).
 23. Giorgi JJS. Untersuchung von *Calendula officinalis*, *Echinacea angustifolia* und *Streptococcus mutans*. *Ärztezeitschrift für Naturheilverfahren*. 2004 Abril; 45(4).
 24. Maji Shankar S, Gururaj Bardvalli S, Jyotirmayee R, Chethana , Bushan K, Kumar S. Efficacy of *Calendula Officinalis* Extract(Marigold Flower) as an Antimicrobial Agent against Oral Microbes: An vitro Study in Comparison with Chlorhexidine Digluconate. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2017 Octubre; 11(10).
 25. Campos Ferreira Filho JC, Cavalcanti Gondim BL, Alves de Cunha D, Cadete de Figueredo C, Gondim Valença AM. Physical Properties and antibacterial activity of herbal tinctures of *Calendula (Calendula Officinalis L.)* and Cashew Tree (*Anacardium occidentale L.*). *The Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clinica Integrada*. 2014; 14(1).
 26. Russo F, Rodriguez Morcelle MI, Apóstolo NM. Flavonoides de *Calendula officinalis* L. bajo cultivo. Efecto de diferentes fechas de siembra y fertilizacion. *Dominguezia*. 2015 Enero; 31(1).
 27. Agudelo Londoño CY. Aprovechamiento Agroindustrial de la *Calendula (Calendula officinalis)* mediante la produccion de un gel desinflamatorio a partir de celulosa. Tesis. Santiago de Cali, Colombia: Universidad de San Buenaventura, Programa de ingenieria agroindustrial; 2011.
 28. Manrique Campos LK. Efectividad antimicrobiana de la clorhexidina y la *Calendula officinalis* en las suturas de seda negra 3/0 pos exodoncia. Tesis. Lima, Peru: Universidad de San Martin de Porres, Facultad de Odontología; 2016.

29. Mogrovejo Valdivia AC. Determinacion del efecto cicatrizante de un gel estandarizado de *Calendula officinalis* L. (*Calendula*) en animales de experimentado. Tesis. Arequipa: Universidad Catolica de Santa Maria, Facultad de ciencias farmaceuticas, bioquimicas y biotecnologicas; 2014.
30. Cahuana Pineda V, Condori Cueva V. Efectividad inhibitooria in vitro del extracto etanolico del *Eucalyptus globulus* sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* Puno 2017. Tesis. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Escuela profesional de odontolgia; 2017.
31. Cano Araujo D, Quispe Eduardo BA. Efecto inhibitorio in vitro de la infusion y aceite esencial de *Caesalpina spinosa* (TARA) sobre las cepas de *Streptococcus mutans* Puno 2017. Tesis. Puno, Peru: Universidad Nacional de Altiplano, Escuela profesional de odontologia; 2017.
32. Organizacion mundial de la salud. WHO monographs on selected medicinal plants Ginebra: World Healt Organization; 2004.
33. Mehta D, Rastogi P, Kumar A, Kumar Chaudhary A. Review on pharmacological update: *Calendula officinalis* Linn. *Inventi Journals*. 2012 Octubre; 2012(4).
34. Butnariu M, Coradini Zepa C. Evaluation of biological active compounds from *calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. *Chemistry Central Journal*. 2012; 6(35).
35. Lastra Valdes H, Piquet Garcia R. *Calendula Officinalis*. *Rev Cuabana Farm*. 1999; 33(3).
36. Baskaran K. Pharmacological Activities of *Calendula officinalis*. *International Journall of Science and Research (IJSR)*. 2017 Mayo; 6(5).
37. Linares Gimeno N. *Plantas Medicinales*. Primera ed. Madrid: UPA; 2013.
38. Raal A, Kirsipuu K. Total Flavonoid content in varieties of *Calendula officinalis* L. originating from diferent countries and cultivated in Estonia. *Natural Product Research*. 2011 Marzo; 25(6).
39. Committe on Herbal Medicinal Products. European Medicines Agency Science Medicines Healt. [Online].; 2018 [cited 2019 Mayo 3]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-report/final-assessment-report-calendula-officinalis-l-flos-revision-1_en.pdf.
40. Basch E, Bent S, Foppa I, Haskmi S, Kroll D, Mele M, et al. Marigold (*Calendula Officinalis* L.). *Journal of Herbal Pharmacotherapy*. 2006; 6(3/4).
41. Murphy Cowan M. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999 Octubre; 12(4).
42. Madrid Ahumada MA, Mahecha Donato LC, Oviedo Peñaloza VA, Chavez Clavijo M, Roa Molina NS, Garcia Robayo DA, et al. Efecto de la *Calendula officinalis* en la proliferación de fibroblasto gingival humano. *Univ Odontol*. 2010 Julio; 29(63).
43. Lagarto A, Bueno V, Guerra I, Valdés O, Vega Y, Torres L. Acute and subchronic oral toxities of *Calendula officinalis* extract in Wistar rats. Elsevier, *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2010 Febrero; 63(2011).
44. Cardetey Garcia J. Empleo de medicina natural y tradicional en el tratamiento estomatologico. *Scielo*. 2015; 19(3).
45. Bascones Martines A, Aguirre Urizar JM, Bermejo Fenoll A, Blanco Carrion A, Gay Escoda C, Gonzales Moles MA, et al. Documento de consenso sobre el tratamiento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogénicas. *Avances en odontoestomatologia*. 2005; 21(6).

46. Marsh PD, Martin MV. Oral Microbiology. Quinta ed. Taylor A, Veronica W, editors.: Churchill Livingstone Elsevier; 2009.
47. Ojeda Garces JC, Oviedo Garcia E, Salas LA. Streptococcus mutans y caries dental. CES odontologia. 2013; 26(1).
48. Cordies Jackson L, Manchado Reyes LA, Hamilton Cordies ML. Principios generales de la terapeutica antimicrobiana. Acta Medica. 1998; 8(1).
49. Universidad de la Republica. Temas de Bacteriologia y Virologia Medica. Segunda ed. Montevideo, Uruguay: Oficina del libro FEFMUR; 2006.
50. Rojas JJ, Garcia AM, Lopez J. Evaluacion de dos metodologias para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas. 2005 Marzo; 4(2).
51. Cardozo Gutierrez RH, Córdoba Cárdenas SL, Gonzales Corredor JD, Guzman Castañeda JR, Lancheros Redondo HO, Mesa Castellanos LI, et al. Especies útiles en la region andina de colombia Tomo II Bogota, Colombia: Imprenta Nacional de Colombia; 2009.
52. Perez C. A, Rojas S. J, Rodriguez J, Doncel M. , Arrieta A. I, Arrieta A. J, et al. Evaluacion de metodos para medir la actividad inhibitoria de extractos vegetales nativos del departamento de sucre sobre bacterias y levaduras patogenas. Rev. Colombiana cienc.Anim. 2011; 3(1).
53. Fuentes Fiallo VR, Lemes Hernandez M, Rodriguez Ferrada CA, Germosen Robineau L. Manual de cultivo y conservacion de plantas medicinales. Primera ed. Robineau L, editor. Cuba: Centenario S.A.; 2000.
54. Carrion Jara AV, Garcia Gomez CR. Preparación de extractos vegetales determinacion de eficiencia de metódica. Tesis. Cuenca, Ecuador: Universidad de cuenca, Facultad de ciencias quimicas; 2010.
55. Pazmiño Pacheco JS. Analisis de los metodos de extraccion de la flor de calendula (calendula officinalis) para productos agroindustriales. Tesis. Facultad de ingenieria y ciencias aplicadas; 2018.
56. Amaguaña Rojas FJ, Churu Chumbi EF. Estandarizacion fitoquímica del extracto de calendula. Tesis. Quito: Universidad politecnica salesiana sede Quito, Ingenieria en biotecnologia de los recursos naturales; 2018.
57. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Farmacopea Brasileña. Quinta ed. Sanitaria ANdV, editor. Brazil; 2010.

ANEXOS

ANEXO A

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Concentraciones y controles	Nro. de placa Petri	Mediciones de halos de inhibición					
		Repeticiones de discos sensitivos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Calendula officinalis</i> L. al 25 %	1	14.5mm	14.7mm	14.4mm	14.5mm	14.8mm	14.5mm
	2	14.7mm	14.5mm	14.8mm	14.3mm	14.6mm	14.3mm
	3	14.5mm	14.6mm	14,5mm	14.4mm	14.5mm	14.7mm
	4	14.5mm	14.5mm	14.5mm	14.6mm	14.5mm	14.8mm
	5	14.3mm	14.3mm	14.2mm	14.5mm	14.4mm	14.3mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 50 %	6	16.5mm	16.3mm	16.3mm	16.3mm	16.3mm	16.3mm
	7	16.2mm	16.3mm	16.2mm	16.2mm	16.2mm	16.2mm
	8	16.5mm	16.5mm	16.5mm	16.5mm	16.3mm	16.3mm
	9	16.5mm	16.5mm	16.5mm	16.5mm	16.3mm	16.3mm
	10	16.3mm	16.3mm	16.3mm	16.2mm	16.2mm	16.2mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 75 %	11	13.8mm	13.9mm	13.6mm	13.9mm	13.6mm	13.8mm
	12	13.5mm	13,9mm	13.5mm	13.3mm	13.3mm	13.3mm
	13	14.5mm	14.5mm	14.3mm	14.3mm	14.3mm	14.5mm
	14	13.8mm	13,5mm	13.6mm	13.4mm	13.3mm	13.4mm
	15	13.2mm	13.5mm	13.6mm	13.7mm	13.8mm	13.6mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 100 %	16	15.3mm	15.4mm	15.5mm	15.2mm	15.5mm	15.3mm
	17	15.7mm	15.6mm	15.7mm	15.8mm	15.6mm	15.9mm
	18	15.4mm	15.3mm	15.5mm	15.6mm	15.6mm	15.7mm
	19	15.8mm	15.7mm	15.9mm	15.4mm	15.6mm	15.3mm
	20	15.5mm	15.6mm	15.7mm	15.4mm	15.3mm	15.4mm
Clorhexidina al 0.12% (control positivo)	21	17.8mm	17.2mm	17.5mm	17.6mm	17.4mm	17.6mm
	22	17.4mm	17.6mm	17.3mm	17.2mm	17.5mm	17.4mm
	23	17.7mm	17.8mm	17.9mm	17.4mm	17.1mm	17.2mm
	24	17.3mm	17.5mm	17.6mm	17.8mm	17.7mm	17.8mm
	25	17.9mm	17.3mm	17.1mm	17.2mm	17.3mm	17.4mm
Agua Destilada (control negativo)	26	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	27	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	28	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	29	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	30	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm

FECHA: 24/09/2019

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Concentraciones y controles	Nro. de placa Petri	Mediciones de halos de inhibición					
		Repeticiones de discos sensitivos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Calendula officinalis</i> L. al 25 %	1	13.2mm	12.2mm	12.7mm	12.7mm	12.2mm	12.2mm
	2	12.4mm	12.2mm	12.2mm	12.7mm	12.7mm	12.2mm
	3	14.2mm	14.7mm	13.2mm	14.2mm	14.8mm	14.8mm
	4	13.7mm	13.7mm	14.8mm	13.2mm	13.2mm	13.2mm
	5	14.7mm	14.2mm	14.7mm	14.7mm	14.2mm	13.7mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 50 %	6	20.3mm	20.3mm	20.3mm	20.3mm	20.8mm	20.8mm
	7	19.8mm	19.8mm	19.8mm	19.8mm	19.3mm	19.8mm
	8	22.2mm	22.7mm	22.2mm	22.2mm	21.7mm	22.7mm
	9	19.8mm	19.3mm	19.8mm	19.8mm	19.3mm	19.8mm
	10	19.8mm	19.8mm	19.8mm	19.8mm	20.3mm	19.8mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 75 %	11	12.2mm	12.2mm	11.7mm	11.7mm	12.5mm	12.7mm
	12	12.2mm	11.7mm	12.7mm	12.2mm	12.2mm	12.2mm
	13	13.3mm	13.2mm	12.2mm	13.2mm	12.7mm	12.7mm
	14	12,2mm	13.2mm	13.7mm	12.7mm	12.7mm	12.7mm
	15	11.7mm	12,2mm	13.2mm	13.2mm	12.2mm	12.7mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 100 %	16	15mm	15mm	16mm	15mm	15mm	15mm
	17	16mm	16mm	16mm	16mm	16mm	16mm
	18	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm
	19	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm
	20	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm	15mm
Clorhexidina al 0.12% (control positivo)	21	18mm	18mm	18mm	18mm	18mm	21mm
	22	21mm	23mm	21mm	21mm	18mm	18mm
	23	19mm	19mm	18mm	21mm	21mm	22mm
	24	21mm	21mm	18mm	18mm	18mm	19mm
	25	18mm	21mm	21mm	22mm	21mm	21mm
Agua Destilada (control negativo)	26	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	27	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	28	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	29	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	30	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm

FECHA: 25/09/2019

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Concentraciones y controles	Nro. de placa Petri	Mediciones de halos de inhibición					
		Repeticiones de discos sensitivos					
		1	2	3	4	5	6
<i>Calendula officinalis</i> L. al 25 %	1	9.3mm	9.8mm	9.8mm	9.2mm	9.3mm	10.3mm
	2	8.8mm	8.8mm	8.3mm	8.3mm	9.3mm	9.3mm
	3	7.8mm	8.3mm	8.8mm	7.8mm	8.3mm	8.3mm
	4	9.8mm	8.8mm	8.8mm	10.2mm	8.3mm	9.3mm
	5	8.8mm	8.8mm	8.8mm	8.3mm	8.3mm	8.3mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 50 %	6	15.5mm	15.5mm	18.5mm	19.5mm	18.5mm	18mm
	7	16.5mm	17mm	16.5mm	15.5mm	14.5mm	15.5mm
	8	20.5mm	20.5mm	22.5mm	21.5mm	21.5mm	22mm
	9	16.5mm	17mm	16.5mm	15.5mm	14.5mm	15.5mm
	10	20,5mm	20.5mm	16.5mm	17mm	17mm	17mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 75 %	11	10.6mm	10.6mm	10.1mm	10.1mm	10.6mm	10.6mm
	12	10.6mm	10.1mm	10.1mm	10.1mm	10.1mm	10.1mm
	13	10.9mm	11.6mm	11.4mm	11.6mm	10.6mm	10.6mm
	14	10.6mm	11.6mm	11.6mm	10.5mm	10.5mm	10.5mm
	15	10.5mm	10mm	10.5mm	10.5mm	10.5mm	10.5mm
<i>Calendula officinalis</i> L. al 100 %	16	12.8mm	13.3mm	13.8mm	13.8mm	12.8mm	13.8mm
	17	13.8mm	13.8mm	13.8mm	13.3mm	13.8mm	13.3mm
	18	13.3mm	12.8mm	13.3mm	13.8mm	13.8mm	12.3mm
	19	13.8mm	13.8mm	13.3mm	13.8mm	13.8mm	14.3mm
	20	14.8mm	13.7mm	14.2mm	13.4mm	13.8mm	13.7mm
Clorhexidina al 0.12% (control positivo)	21	15mm	15mm	14.5mm	15.5mm	14.5mm	21mm
	22	19mm	20.5mm	19mm	19mm	15mm	15mm
	23	19mm	15mm	14mm	19mm	19mm	20.5mm
	24	19mm	19mm	15mm	15mm	14.5mm	15.5mm
	25	14mm	19mm	19mm	20.5mm	19mm	19mm
Agua Destilada (control negativo)	26	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	27	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	28	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	29	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	30	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm

FECHA: 26/09/2019

ANEXO B



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS AMBIENTALES
SALUD Y BIODIVERSIDAD - IICASB**

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

El que suscribe, Alfredo Loza Del Carpio, Director del Instituto de Investigaciones en Ciencias Ambientales, Salud y Biodiversidad – IICASB, de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, hace constar que:

A solicitud presentada por YAIR ANGEL MAQUERA QUISPE, haciendo requerimiento a la identificación taxonómica a nivel de especie de una planta para futuro uso experimental, el resultado es el siguiente:

ORDEN: ASTERALES

FAMILIA: ASTERACEAE

Nombre científico: *Calendula officinalis* L. 1753

Referencias generales

Es una planta herbácea, anual de 30 a 60 cm de altura, al inicio de su crecimiento forma una roseta y luego desarrolla tallos angulosos y pubescentes; hojas oblongolanceoladas o espatuladas. Inflorescencias en capítulos de 3 a 6 cm de diámetro, flores ligulares marginales anaranjadas y tubulares amarillas mayormente en la parte central, su fruto es un aquenio.

Se trata de una planta principalmente ornamental, originaria de Egipto e introducida a Europa por el siglo XVII y de allí al resto del mundo. En los Andes y el altiplano crece hasta los 4000 msnm, común en jardines y huertos. Florece todo el año, principalmente entre agosto y mayo.

Datos de la muestra

Procedencia: Ciudad de Puno, jardín barrio Vallecito.

Nombre común: “Calendula”, “clavelina”

Fecha colecta: 12 de julio del 2019



Alfredo Loza Del Carpio, M.Sc.
Director IICASB
Área: Biodiversidad Andina

ANEXO C

SOLICITO: Laboratorio de control de calidad

DECANA DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO.



Yo Leslie Skarleht Monroy Ticona identificado con D.N.I. No 74307754, con código de matrícula N° 131135 y Yair Angel Maquera Quispe identificado con D.N.I. 72446809, con código de matrícula N°111846 estudiantes de la Escuela Profesional de Odontología UNA - Puno.

Ante usted con el debido respeto me presento y expongo.

Que habiendo recibido el Acta de aprobación N° 2019 - 593 del proyecto de tesis titulado "EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE CALENDULA OFFICINALIS L. EN STREPTOCOCCUS MUTANS, PUNO-2019", solicitamos a su digno despacho, se nos otorgue el uso del laboratorio de Control de Calidad para el proceso de elaboración del extracto etanolico donde será necesaria una Estufa por 3 días (secado), agitador magnético 2 veces al día, durante 5 minutos, por 7 días (maceración) y además de algunos otros instrumentos de medición (filtrado) según sea el caso, todo con previa coordinación de horarios e insumos, así evitando perjudicar sesiones académicas y otros.

Para tal efecto y mejor entendimiento, adjunto los requisitos solicitados.

REQUISITOS:

- Acta de aprobación del proyecto de Tesis
- Pago por el monto de 100 nuevos soles
- Carta de compromiso por parte de estudiantes para mantener en óptimas condiciones el laboratorio.
- Diagrama de proceso para la elaboración del extracto etanolico.
- Cronograma de uso de laboratorio abierto a modificaciones con el respectivo coordinador de laboratorio.

POR LO EXPUESTO:

Solicito a usted acceder a mi petición por ser justa y legal.

Puno, 11 de Julio de 2019



Leslie Skarleht Monroy Ticona
DNI 74307754



Yair Angel Maquera Quispe
DNI 72446809

ANEXO D



Universidad Nacional del Altiplano - Puno
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD-LCC



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, COORDINADOR DE LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO

HACE CONSTAR:

Que el Sr. YAIR ÁNGEL MAQUERA QUISPE identificado con D.N.I. 72446809, con código de matrícula N° 111846 y la Sra. LESLIE SKARLEHT MONROY TICONA identificado con D.N.I. N° 74307754, con código de matrícula N° 131135, con Grado de Bachiller de la Facultad de Odontología -UNA-PUNO, con el Proyecto de Investigación "EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE CALENDULA OFFICINALIS L. EN STREPTOCOCCUS MUTANS, PUNO- 2019", ha realizado el proceso de elaboración de extracto etanolico de *Calendula officinalis* en el Laboratorio de CONTROL DE CALIDAD de la Facultad de Ingeniería Química, en el mes de julio del presente año, habiendo realizado el pago respectivo para el uso de equipos del laboratorio.

Se expide la presente constancia, a solicitud de los interesados para los fines que estimen por conveniente.

Puno C.U., 14 de agosto del 2019




M.Sc. José Miguel Castiño Prado
Coordinador, Laboratorio Control de Calidad
FACULTAD INGENIERIA QUIMICA
UNA-PUNO

ANEXO E

SOLICITO: Laboratorio de Microbiología

SEÑOR DECANO DE LA FACULTAD DE MEDICINA HUMANA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO.



Yo Yair Angel Maquera Quispe identificado con D.N.I. 72446809, con código de matrícula N°111846 y Leslie Skarleht Monroy Ticona identificado con D.N.I. N° 74307754, con código de matrícula N° 131135 estudiantes de la Escuela Profesional de Odontología UNA - Puno.

Ante usted con el debido respeto me presento y expongo.

Que habiendo recibido el Acta de aprobación N° 2019 - 593 del proyecto de tesis titulado "EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE CALENDULA OFFICINALIS L. EN STREPTOCOCCUS MUTANS, PUNO-2019", solicitamos a su digno despacho, se nos otorgue el uso del laboratorio de Microbiología para el proceso de activación de bacterias, cultivos y medición de halos inhibitorios donde serán necesario varios instrumentos para su realización según sea el caso, todo con previa coordinación de horarios e insumos, así evitando perjudicar sesiones académicas y otros.

POR LO EXPUESTO:

Solicito a usted acceder a mi petición por ser justa y legal.

Puno, 14 de agosto 2019

Leslie Skarleht Monroy Ticona
DNI 74307754

Yair Angel Maquera Quispe
DNI 72446809

ANEXO F



Universidad Nacional del Altiplano - Puno

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

Av. FLORAL 1153 TELEF. 367391 - TELEFAX 367391 - C.U. - CASILLA POSTAL 291

Correo: fmh.@unap.edu.pe



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, DECANO DE LA FACULTAD DE MEDICINA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO PUNO.

HACE CONSTAR:

Que, el Sr. **YAIR ANGEL MAQUERA QUISPE**, identificado con DNI. 72446809, con código de matrícula N°111846, y Srta. **LESLIE SKARLEHT MONROY TICONA**, identificada con DNI 74307754, código de matrícula N°131135, estudiantes de la Escuela Profesional de Odontología Facultad de Ciencias de la Salud de la UNA-PUNO, quienes han realizado su Proyecto de Tesis titulado: **“EVALUACION IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANOLICO DE CALENDULA OFFICINALIS L. EN STREPTOCOCCUS MUTANS, PUNO 2019”**, en el Laboratorio de Microbiología de esta Facultad, en las fecha del 14 de agosto al 24 setiembre del año en curso.

Se expide la presente a solicitud escrita de los interesados, para los fines que estime conveniente.

Puno, 9 de octubre del 2019.



BR. EDUARDO SOTOMAYOR ABARCA
DECANO,
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNA - PUNO

c.c.
Arch.

ANEXO G



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

**CERTIFICADO DE AISLAMIENTO DE CEPA BACTERIANA**

EL QUE SUSCRIBE:

Certifica que la pureza del *Streptococcus mutans* (99 %), se ha obtenido tomando en cuenta el siguiente procedimiento:

1. El medio de cultivo que se utilizó para el aislamiento fue el Agar Mitis Salivarius Con Bacitracina (MSB) mas 20% de sacarosa, además también se usó Agar Sangre para ver la actividad hemolítica de la misma.
2. Para la identificación de *Streptococcus mutans* se tomó en cuenta los criterios fenotípicos.
 - a) Morfología macroscópica (colonias): opacas, convexas e irregulares en forma y superficie granular, α y γ - hemolíticos en Agar Sangre.
 - b) Morfología microscópica y características en tinción: Cocos Gram positivos, se asocian en parejas y cadenas cortas o largas.
 - c) Requerimientos ambientales para el crecimiento: Anaerobios facultativos, aumenta su crecimiento en presencia de CO_2 al 5% y a 37°C.
 - d) Resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos: Sensibles a penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, aminoglucósidos, vancomicina, rifampicina, cotrimoxazol, lincosamidas y cloranfenicol.
 - e) Propiedades bioquímicas: Esculina, inulina, manitol, rafinosa y sorbitol positivos, No producen catalasa y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico.

NOTA: Para la obtención de esta cepa se siguió los métodos estándares propuestos por el Instituto Nacional de Salud.


Balbino Lorgio Palacios Frisancho
BIÓLOGO
C.B.P. N° 2125

ANEXO H

Estadística descriptiva

Descriptivos 24 horas

Solucion de Prueba.				Estadístico	Desv. Error		
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Agua Destilada	Media		,000	,0000		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,000			
			Límite superior	,000			
		Media recortada al 5%		,000			
		Mediana		,000			
		Varianza		,000			
		Desv. Desviación		,0000			
		Mínimo		,0			
		Máximo		,0			
		Rango		,0			
		Rango intercuartil		,0			
		Asimetría		.	.		
		Curtosis		.	.		
		Calendula Officinalis al 25%		Media		14,507	,0291
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	14,447	
Límite superior	14,566						
Media recortada al 5%				14,506			
Mediana				14,500			
Varianza				,025			
Desv. Desviación				,1596			
Mínimo				14,2			
Máximo				14,8			
Rango				,6			
Rango intercuartil				,2			
Asimetría				,211	,427		
Curtosis				-,396	,833		
Calendula Officinalis al 50%				Media		16,333	,0216
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	16,289	
		Límite superior	16,378				
		Media recortada al 5%		16,331			
		Mediana		16,300			
		Varianza		,014			
		Desv. Desviación		,1184			
		Mínimo		16,2			
		Máximo		16,5			
		Rango		,3			
		Rango intercuartil		,3			
		Asimetría		,494	,427		
		Curtosis		-1,290	,833		
		Calendula Officinalis al 75%		Media		13,740	,0711
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	13,595	
Límite superior	13,885						
Media recortada al 5%				13,726			
Mediana				13,600			
Varianza				,151			
Desv. Desviación				,3892			
Mínimo				13,2			
Máximo				14,5			
Rango				1,3			
Rango intercuartil				,4			
Asimetría				,759	,427		
Curtosis				-,425	,833		
Calendula Officinalis al 100%				Media		15,540	,0348
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	15,469	
		Límite superior	15,611				
		Media recortada al 5%		15,537			
		Mediana		15,550			
		Varianza		,036			
Desv. Desviación		,1905					

	Minimo		15,2	
	Máximo		15,9	
	Rango		,7	
	Rango intercuartil		,3	
	Asimetría		,149	,427
	Curtosis		-,824	,833
Clorhexidina al 0.12%	Media		17,483	,0440
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	17,393	
		Límite superior	17,573	
	Media recortada al 5%		17,481	
	Mediana		17,450	
	Varianza		,058	
	Dev. Desviación		,2408	
	Minimo		17,1	
	Máximo		17,9	
	Rango		,8	
Rango intercuartil		,4		
	Asimetría		,178	,427
	Curtosis		-1,075	,833

a. Tiempo de exposición = 24 horas

Descriptivos 48 horas

Solucion de Prueba.			Estadístico	Dev. Error	
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Agua Destilada	Media	,000	,0000	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,000	
			Límite superior	,000	
		Media recortada al 5%		,000	
		Mediana		,000	
		Varianza		,000	
		Dev. Desviación		,0000	
		Minimo		,0	
		Máximo		,0	
		Rango		,0	
		Rango intercuartil		,0	
		Asimetría		.	.
		Curtosis		.	.
		Calendula Officinalis al 25%		Media	13,443
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior			13,079	
	Límite superior			13,807	
Media recortada al 5%				13,437	
Mediana				13,200	
Varianza				,949	
Dev. Desviación				,9744	
Minimo				12,2	
Máximo				14,8	
Rango				2,6	
Rango intercuartil				1,8	
Asimetría				,096	,427
Curtosis				-1,516	,833
Calendula Officinalis al 50%				Media	20,397
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	20,010	
			Límite superior	20,783	
		Media recortada al 5%		20,330	
		Mediana		19,800	
		Varianza		1,070	
		Dev. Desviación		1,0344	
		Minimo		19,3	
		Máximo		22,7	
		Rango		3,4	
		Rango intercuartil		1,0	
		Asimetría		1,250	,427
		Curtosis		,259	,833
		Calendula Officinalis al 75%		Media	12,530
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior			12,330	
	Límite superior			12,730	

		Media recortada al 5%	12,519	
		Mediana	12,600	
		Varianza	,286	
		Desv. Desviación	,5344	
		Mínimo	11,7	
		Máximo	13,7	
		Rango	2,0	
		Rango intercuartil	,6	
		Asimetría	,231	,427
		Curtosis	-,604	,833
	Calendula Officinalis al 100%	Media	15,113	,0495
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	15,012
			Límite superior	15,215
		Media recortada al 5%	15,126	
		Mediana	15,000	
		Varianza	,074	
		Desv. Desviación	,2713	
		Mínimo	14,5	
		Máximo	15,5	
		Rango	1,0	
		Rango intercuartil	,4	
		Asimetría	-,117	,427
		Curtosis	,155	,833
	Clorhexidina al 0.12%	Media	19,683	,2970
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	19,076
			Límite superior	20,291
		Media recortada al 5%	19,630	
		Mediana	20,000	
		Varianza	2,646	
		Desv. Desviación	1,6267	
		Mínimo	18,0	
		Máximo	22,5	
		Rango	4,5	
		Rango intercuartil	3,0	
		Asimetría	,118	,427
		Curtosis	-1,780	,833

a. Tiempo de exposición = 48 horas

Descriptivos 72 horas

Solucion de Prueba.		Estadístico	Desv. Error		
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Agua Destilada	Media	,000		
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	,000	
			Límite superior	,000	
		Media recortada al 5%	,000		
		Mediana	,000		
		Varianza	,000		
		Desv. Desviación	,0000		
		Mínimo	,0		
		Máximo	,0		
		Rango	,0		
		Rango intercuartil	,0		
		Asimetría	.	.	
		Curtosis	.	.	
			Calendula Officinalis al 25%	Media	8,877
				95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior
			Límite superior	9,124	
		Media recortada al 5%	8,859		
		Mediana	8,800		
		Varianza	,438		
		Desv. Desviación	,6616		
		Mínimo	7,8		
		Máximo	10,3		
		Rango	2,5		
		Rango intercuartil	1,0		
		Asimetría	,478	,427	

	Curtosis		-.413	.833
Calendula Officinalis al 50%	Media		17,833	.4357
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	16,942	
		Límite superior	18,724	
	Media recortada al 5%		17,769	
	Mediana		17,000	
	Varianza		5,695	
	Desv. Desviación		2,3865	
	Mínimo		14,5	
	Máximo		22,5	
	Rango		8,0	
	Rango intercuartil		5,0	
	Asimetría		.515	.427
	Curtosis		-.996	.833
	Calendula Officinalis al 75%	Media		10,607
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	10,424	
		Límite superior	10,789	
Media recortada al 5%			10,583	
Mediana			10,500	
Varianza			.239	
Desv. Desviación			.4884	
Mínimo			10,0	
Máximo			11,6	
Rango			1,6	
Rango intercuartil			.5	
Asimetría			1,047	.427
Curtosis			.311	.833
Calendula Officinalis al 100%		Media		13,627
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	13,465	
		Límite superior	13,788	
	Media recortada al 5%		13,617	
	Mediana		13,800	
	Varianza		.188	
	Desv. Desviación		.4331	
	Mínimo		12,8	
	Máximo		14,8	
	Rango		2,0	
	Rango intercuartil		.5	
	Asimetría		.106	.427
	Curtosis		1,131	.833
	Clorhexidina al 0.12%	Media		17,133
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	16,229	
		Límite superior	18,037	
Media recortada al 5%			17,102	
Mediana			17,250	
Varianza			5,861	
Desv. Desviación			2,4209	
Mínimo			14,0	
Máximo			21,0	
Rango			7,0	
Rango intercuartil			4,0	
Asimetría			.099	.427
Curtosis			-1,765	.833

a. Tiempo de exposición = 72 horas

Pruebas de normalidad

Pruebas de normalidad / 24 horas

Solucion de Prueba.	Estadístico	Kolmogorov-Smirnov ^b		Sig.	Shapiro-Wilk Estadístico
			gl		
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Agua Destilada	.	30	.	.
	Calendula Officinalis al 25%	.217	30	.001	.927
	Calendula Officinalis al 50%	.311	30	.000	.776
	Calendula Officinalis al 75%	.174	30	.021	.898
	Calendula Officinalis al 100%	.136	30	.168	.953
	Clorhexidina al 0.12%	.135	30	.169	.946

Pruebas de normalidad / 24 horas

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Solucion de Prueba.	Shapiro-Wilk ^b	
		gl	Sig.
	Agua Destilada	30	.
	Calendula Officinalis al 25%	30	,040
	Calendula Officinalis al 50%	30	,000
	Calendula Officinalis al 75%	30	,008
	Calendula Officinalis al 100%	30	,208
	Clorhexidina al 0.12%	30	,131

a. Tiempo de exposición = 24 horas
b. Corrección de significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad / 48 horas

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Solucion de Prueba.	Kolmogorov-Smirnov ^b		Shapiro-Wilk	
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico
	Agua Destilada	.	30	.	.
	Calendula Officinalis al 25%	,148	30	,092	,882
	Calendula Officinalis al 50%	,285	30	,000	,771
	Calendula Officinalis al 75%	,198	30	,004	,921
	Calendula Officinalis al 100%	,329	30	,000	,783
	Clorhexidina al 0.12%	,291	30	,000	,773

a. Tiempo de exposición = 48 horas
b. Corrección de significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad / 48 horas

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Solucion de Prueba.	Shapiro-Wilk ^b	
		gl	Sig.
	Agua Destilada	30	.
	Calendula Officinalis al 25%	30	,003
	Calendula Officinalis al 50%	30	,000
	Calendula Officinalis al 75%	30	,028
	Calendula Officinalis al 100%	30	,000
	Clorhexidina al 0.12%	30	,000

a. Tiempo de exposición = 48 horas
b. Corrección de significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad / 72 horas

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Solucion de Prueba.	Kolmogorov-Smirnov ^b		Shapiro-Wilk	
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico
	Agua Destilada	.	30	.	.
	Calendula Officinalis al 25%	,179	30	,015	,927
	Calendula Officinalis al 50%	,203	30	,003	,912
	Calendula Officinalis al 75%	,305	30	,000	,808
	Calendula Officinalis al 100%	,244	30	,000	,878
	Clorhexidina al 0.12%	,280	30	,000	,823

a. Tiempo de exposición = 72 horas
b. Corrección de significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad / 72 horas

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Solucion de Prueba.	Shapiro-Wilk ^b	
		gl	Sig.
	Agua Destilada	30	.
	Calendula Officinalis al 25%	30	,042
	Calendula Officinalis al 50%	30	,017
	Calendula Officinalis al 75%	30	,000
	Calendula Officinalis al 100%	30	,003
	Clorhexidina al 0.12%	30	,000

a. Tiempo de exposición = 72 horas
b. Corrección de significación de Lilliefors

**Estadística inferencial
Prueba de Mann-Whitney / 24 horas**

Rangos^a

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Solucion de Prueba.	N	Rango promedio	Suma de rangos
	Calendula Officinalis al 50%	30	15,50	465,00
	Clorhexidina al 0.12%	30	45,50	1365,00
	Total	60		

a. Tiempo de exposición = 24 horas

Estadísticos de prueba^{a,b}

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	
U de Mann-Whitney	,000
W de Wilcoxon	465,000
Z	-6,712
Sig. asintótica (bilateral)	,000

a. Tiempo de exposición = 24 horas
b. Variable de agrupación: Solucion de Prueba.

Prueba de Mann-Whitney / 48 horas

		Rangos ^a		
Solucion de Prueba.		N	Rango promedio	Suma de rangos
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Calendula Officinalis al 50%	30	33,30	999,00
	Clorhexidina al 0.12%	30	27,70	831,00
	Total	60		

a. Tiempo de exposición = 48 horas

Estadísticos de prueba^{a,b}

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	
U de Mann-Whitney	366,000
W de Wilcoxon	831,000
Z	-1,261
Sig. asintótica(bilateral)	,207

a. Tiempo de exposición = 48 horas
 b. Variable de agrupación: Solucion de Prueba.

Prueba de Mann-Whitney / 72 horas

		Rangos ^a		
Solucion de Prueba.		N	Rango promedio	Suma de rangos
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Calendula Officinalis al 50%	30	33,50	1005,00
	Clorhexidina al 0.12%	30	27,50	825,00
	Total	60		

a. Tiempo de exposición = 72 horas

Estadísticos de prueba^{a,b}

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	
U de Mann-Whitney	360,000
W de Wilcoxon	825,000
Z	-1,340
Sig. asintótica(bilateral)	,180

a. Tiempo de exposición = 72 horas
 b. Variable de agrupación: Solucion de Prueba.

Prueba de Kruskal-Wallis / 24 horas

		Rangos ^a	
Solucion de Prueba.		N	Rango promedio
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Agua Destilada	30	15,50
	Calendula Officinalis al 25%	30	73,65
	Calendula Officinalis al 50%	30	135,50
	Calendula Officinalis al 75%	30	47,35
	Calendula Officinalis al 100%	30	105,50
	Clorhexidina al 0.12%	30	165,50
	Total	180	

a. Tiempo de exposición = 24 horas

Estadísticos de prueba^{a,b,c}

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	
H de Kruskal-Wallis	173,947
gl	5
Sig. asintótica	,000

a. Tiempo de exposición = 24 horas
 b. Prueba de Kruskal Wallis
 c. Variable de agrupación: Solucion de Prueba.

Prueba de Kruskal-Wallis / 48 horas

Rangos^a

Solucion de Prueba.		N	Rango promedio
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Agua Destilada	30	15,50
	Calendula Officinalis al 25%	30	68,82
	Calendula Officinalis al 50%	30	153,30
	Calendula Officinalis al 75%	30	52,65
	Calendula Officinalis al 100%	30	105,03
	Clorhexidina al 0.12%	30	147,70
	Total	180	

a. Tiempo de exposición = 48 horas

Estadísticos de prueba^{a,b,c}

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)

H de Kruskal-Wallis	166,564
gl	5
Sig. asintótica	,000

- a. Tiempo de exposición = 48 horas
- b. Prueba de Kruskal Wallis
- c. Variable de agrupación: Solucion de Prueba.

Prueba de Kruskal-Wallis / 72 horas

Rangos^a

Solucion de Prueba.		N	Rango promedio
Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)	Agua Destilada	30	15,50
	Calendula Officinalis al 25%	30	46,03
	Calendula Officinalis al 50%	30	153,43
	Calendula Officinalis al 75%	30	74,97
	Calendula Officinalis al 100%	30	105,90
	Clorhexidina al 0.12%	30	147,17
	Total	180	

a. Tiempo de exposición = 72 horas

Estadísticos de prueba^{a,b,c}

Actividad Antimicrobiana (Halos inhibitorios)

H de Kruskal-Wallis	169,578
gl	5
Sig. asintótica	,000

- a. Tiempo de exposición = 72 horas
- b. Prueba de Kruskal Wallis
- c. Variable de agrupación: Solucion de Prueba.

ANEXO I

GALERÍA DE FOTOS



Planta: *Calendula officinalis* (Dormilonas)



Flor de *Caléndula officinalis* (Dormilonas)



Deseccación de las flores de *Caléndula officinalis*



Flores desecadas después de 24 horas



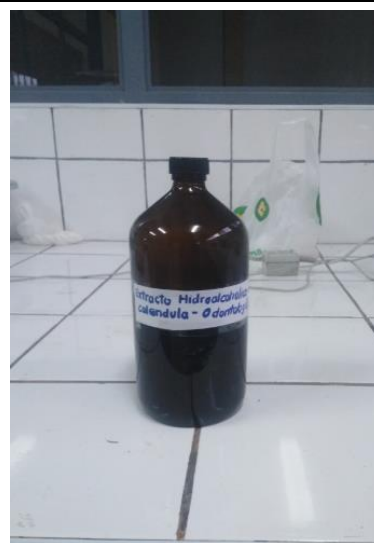
Trituración de la *Caléndula officinalis*



Polvo de la *Caléndula officinalis* guardada en caja de anaerobiosis



Polvo de la *Caléndula officinalis*
remojado en alcohol de 96°



Maceración del extracto por 15 días



Filtrado del extracto etanólico



Filtrado del extracto etanólico



Esterilización de placas Petri y tubos de
ensayo



Materiales usados en el aislamiento



Medición del peso del agar.



Preparación de los agares con agua
destilada estéril.



Ebullición de los agares preparados.



Esterilización de los agares.



Plaqueado.



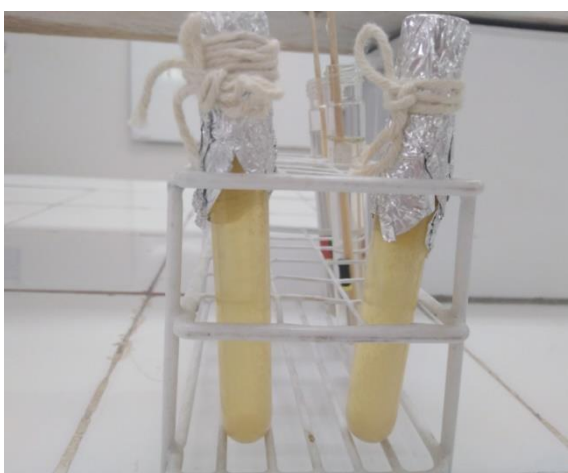
Colocación de placas Petri en caja de
anaerobiosis por 24 horas.



Colocación de placas en aerobiosis por 24 horas



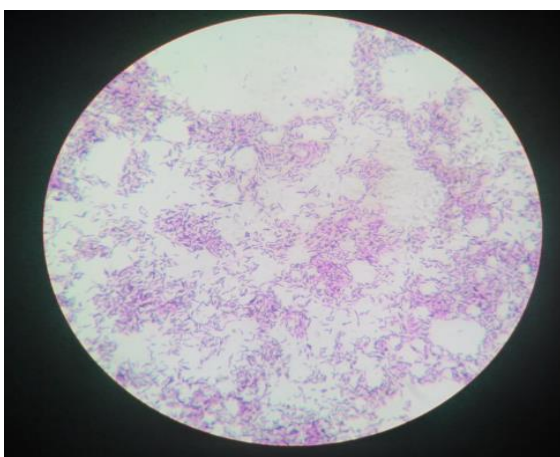
Selección de colonia de Streptococcus para inocular a tubo de ensayo



Inoculación de colonia seleccionada de placa Petri a tubo de ensayo.



Tubo de ensayo después de 24 horas en la incubadora



Observación al microscopio después de la tinción



Replicación de las bacterias con agar Mitis Salivarius más bacitracina



Se colocó en la caja de anaerobiosis 24 horas y posteriormente en aerobiosis por 24 horas



Placa Petri con *Mitis Salivarius* + bacitracina después de 24 horas en aerobiosis.



Estandarización de McFarland



Replicación a las 30 placas Petri



Elaboración de los pozos y colocación de discos de sensibilidad



Colocación de extracto en distintas concentraciones.



Colocación de las placas Petri en la incubadora en aerobiosis por 24 horas



Extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 25 %



Extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 50 %



Extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 75 %



Extracto etanólico de *Calendula officinalis* al 100 %



Medición de los halos inhibitorios con vernier