



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

TESIS

EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO
ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
ETANOLICO DE PUNICA GRANATUM (GRANADA)
SOBRE
STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175)

PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA

PRESENTADO POR:

BACHILLER: GUTIERREZ ABAD, KARINA

ASESOR: MG. ELOY GAMBOA ALVARADO

LIMA-PERÚ

2021

DEDICATORIA

En memoria a mi padre que en el cielo
comparte mi dicha.

A mi madre y a mis tías por su apoyo
incondicional a lo largo de mi carrera
universitaria.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la universidad alas peruanas por permitirme realizar mi tesis en sus instalaciones
- Agradezco a mi asesor el Dr. Eloy gamboa Alvarado por guiarme a lo largo de la elaboración de este estudio
- Agradezco a mi familia por su apoyo a lo largo de mi carrera
- Agradezco a Jimi rojas por apoyarme en la ejecución de mi proyecto

RESUMEN

El objetivo de este estudio in vitro es determinar el efecto antibacteriano es sus diferentes concentraciones de la Punica granatum granada sobre una cepa de Streptococcus mutans ATCC25175, para el grupo control se utilizó clorhexidina al 0,12%.

Se realizó un tipo de estudio transversal aplicativo de diseño experimental. Se preparó el extracto etanólico de Punica granatum y se diluyo con alcohol al 96° para obtener las concentraciones de 25%, 50%,75% y 100%. La cepa de Streptococcus mutans fue activada en agar tripticasa de soya (TSA) enriquecido con sangre y luego fue llevada a la incubadora a 37° por 24 horas, transcurrido el tiempo se obtuvieron colonias nuevas, las cuales se llevaron a un tubo de ensayo que contenía 4 ml de agua destilada estéril, hasta obtener una turbidez de 0,5 en la escala McFarland. luego se realizó el sembrado mediante el método de difusión de discos en agar miuller Hinton en 10 placas por cada concentración de 25%,50%,75 y 100%y se llevó a la incubadora a 37°. La observación se hizo a las 24, 48 y 72 horas. Se realizaron pruebas no paramétricas, el mayor efecto antibacteriano fue a las 24 horas y el menor efecto antibacteriano fue la concentración de 25 % con media de $16,57\pm 0,23$ y el mayor efecto antibacteriano se obtuvo en la concentración de 100 % con una media de $26,79\pm 0,10$ al 100%. Se concluyó que las concentraciones de extracto de Punica granatum al 75% y 100% son similares al control positivo.

SUMMARY

The objective of this in vitro study is to determine the antibacterial effect of different concentrations of the Punica granatum pomegranate on a strain of Streptococcus mutans ATCC25175, for the control group 0.12% chlorhexidine was used.

A type of experimental cross-sectional study of experimental design was carried out. The ethanol extract of Punica granatum was prepared and diluted with 96 ° alcohol to obtain the concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%. The Streptococcus mutans strain was activated in blood-rich soy tripticase agar (TSA) and was then taken to the incubator at 37 ° for 24 hours, after which time new colonies were obtained, which were taken to a test tube that it contained 4 ml of sterile distilled water, until a turbidity of 0.5 was obtained on the McFarland scale. Seeding was then carried out by means of the method of diffusion of discs in Hinton miuller agar in 10 plates for each concentration of 25%, 50%, 75 and 100% and the incubator was brought to 37 °. The observation was made at 24, 48 and 72 hours. Non-parametric tests were performed, the greatest antibacterial effect was at 24 hours and the lowest antibacterial effect was the concentration of 25% with a mean of 16.57 +/- 0.23 and the highest antibacterial effect was obtained at the concentration of 100 % with an average of 26.79 +/- 0.10 at 100%. It was concluded that the concentrations of Punica granatum extract at 75% and 100% are similar to the positive control.

ÍNDICE	pág.
CAPITULO I: PLANEAMIENTO DEL PROBLEMA	
1.1. Descripción de la realidad problemática	17
1.2. Formulación del problema	20
1.3 Objetivos de la investigación	21
1.4 Justificación de la investigación	22
1.4.1. Importancia de la investigación	23
1.4.2. Viabilidad de la investigación	24
1.5. Limitaciones de estudio	24
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes de la investigación	25
2.2. Bases teóricas	32
2.3. Definición de términos básicos	47
CAPITULO III: HIPOTESIS Y VARIEBLES DE LA INVESTIGACIÓN	
3.1. Formulación de la hipótesis principal y derivados	48
3.2. Variables; definición conceptual y operacional	48
CAPITULO IV: METODOLOGÍA	
4.1. Diseño metodológico	50
4.2. Diseño muestral	50
4.3. Técnicas e instrumentación de recolección de datos	51
4.4. Técnica estadística	55
4.5. Aspectos éticos	56
CAPITULO V: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	
5.1. Análisis descriptivo	58

5.2. Análisis inferencial	64
5.3. Comprobación de hipótesis	71
5.4. Discusión	81
Conclusión	86
Recomendaciones	88
FUENTES DE INFORMACIÓN	89
Anexo1: Instrumento de recolección de datos	97
Anexo 2: constancia de desarrollo de la investigación	98
Anexo 3: Constancia del museo de historia natural	99
Anexo 4: Matriz de consistencia	101
Anexo 4: Fotografías	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Composición nutricional de la parte comestible de Punica granatum.....	30
Tabla N°2. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	54
Tabla N°3. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	55
Tabla N°4. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	56
Tabla N°5. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	58
Tabla N°6. Efecto antibacteriano in vitro (halo de inhibición) del control positivo sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	60
Tabla N°7. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)	61
Tabla N°8. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de	

Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	62
Tabla N° 9. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	63
Tabla N° 10. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	65
Tabla N° 11. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	66
Tabla N° 12. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	67
Tabla N° 13. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	68
Tabla N° 14. Prueba de Normalidad para determinar la distribución de los datos cuantitativos.....	69
Tabla N° 15. Prueba de Kruskal Wallis, para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)...	71

Tabla N° 16. Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)..	72
Tabla N° 17. Prueba de Kruskall Wallis, para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	73
Tabla N° 18. Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	74
Tabla N° 19. Prueba de Kruskall Wallis, para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	74
Tabla N° 20. Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	75
Tabla N° 21. Prueba de Friedman, para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	76

Tabla N° 22. Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	77
Tabla N° 23. Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	78
Tabla N° 24. Prueba de Friedman, para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	79
Tabla N° 25. Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	79
Tabla N° 26. Prueba de Friedman, para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	80
Tabla N° 27. Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum	

(granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....81

INDICE DE GRAFICOS

Grafico N°1. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	59
Grafico N° 2. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	60
Grafico N° 3. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	61
Grafico N° 4. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	62
Grafico N° 5. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del control positivo sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	64
Grafico N° 6. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	65
Grafico N° 7. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175).....	67

Grafico N° 8. Efecto antibacteriano in vitro (halo de inhibición) del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de <i>Streptococcus Mutans</i> (ATCC 25175).....	68
Grafico N° 9. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de <i>Punica granatum</i> (granada) sobre el crecimiento de <i>Streptococcus Mutans</i> (ATCC 25175).....	72

INTRODUCCIÓN

Este estudio, evaluamos el efecto antibacteriano del extracto de *Punica granatum* sobre *Streptococcus mutans* (ATCC25175), se ha lleva a cabo en busca de un medio preventivo y profiláctico a base de un producto natural como lo es granada, para de ese modo poder prevenir la proliferación de microorganismos orales en este caso específicamente el *Streptococcus mutans*, el principal agente de la caries. La caries dental y la enfermedad periodontal se encuentran como una de las enfermedades más comunes en la cavidad oral causando principalmente por la acumulación de microorganismos, los *Streptococcus* oral son las primeras especies aisladas que juegan un papel en la formación de placa dental y desarrollo de caries. A nivel mundial la caries afecta entre 5 y 20 % de la población, mientras que el Perú, según el último estudio realizado por el MINSA, la prevalencia de caries de 90.4%.^{2,4}

Las medidas tomadas para inhibir la acumulación de placa es el cepillado de dientes, uso de hilo dental y enjuague bucal, esto en complemento es muy importante para prevenir la placa, la gingivitis y disminuir la cantidad de microorganismos. La clorhexidina es se encuentra entre los enjuagues bucales más usados, sim embargo tiene algunos efectos secundarios como la alteración del gusto manchas en los dientes y las restauraciones.⁸

Según estudios realizados por diferentes autores la granada posee propiedades muy importes entre ellas, actúa como: antioxidante, anticancerígeno, antifúngico y antibacteriano, además de ser un medio natural, de comprobarse su efectividad, se podría realizar estudios, con otros microorganismos e in vivo, ya que se necesita más investigaciones, que aporten mayor conocimiento, esta

razón el objetivo de esta investigación es evaluar el efecto antibacteriano in vivo del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

En el presente estudio observaremos si el extracto etanólico de *Punica granatum*, tiene efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), esto se llevará a cabo en el laboratorio central de la universidad Alas Peruana, contamos con 5 capítulos, los cuales son desglosados a lo largo de la investigación.

Queremos demostrar con los resultados obtenidos que el efecto antibacteriano de la *Punica granatum* es tan efectivo como el de la clorhexidina al 0,12% y que puede ser utilizado como un medio natural y económico para la elaboración de enjuagues bucales, pastas y etc.

CAPITULO I: PLANEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

Según cifras del Colegio Odontológico del Perú, uno de cada dos personas no tiene acceso a una atención dental en establecimientos públicos como postas, centros de salud y hospitales, a pesar de los programas establecidos por el estado, esto debido a vivir en zonas alejadas con poca accesibilidad u otros factores. La entidad, alertó que de 42 mil cirujanos dentistas a nivel nacional, más de la mitad se concentra en Lima, por lo tanto es necesario fortalecer la atención en las provincias del Perú.¹

Las enfermedades bucodentales a nivel mundial afectan a más 3.9 mil millones de sujetos y la caries que no se ha sido sometida a tratamiento perjudica a más de la mitad de las personas en el mundo (44%), siendo una de las enfermedades más prevalentes de las 291 enfermedades existentes que se encuentran comúnmente a nivel mundial (1990-2010).² La repercusión que tiene las enfermedades dentales en la vida cotidiana es impactante en comparación con otras enfermedades: en adolescentes y adultos, puede llevar en algunos casos, al aislamiento de la sociedad por temor a las críticas, en menores de edad, es una causa frecuente de trastornos del sueño que está relacionado con el dolor y dificultad para poder deglutir en algunos casos.³ En el Perú, según el reporte del MINSA del 2005, demostró una preponderancia de caries en infantes que se encontraban en etapa escolar (12 años), con un 90.6 % en población urbana y 88.7% en la población rural, en donde, el promedio de CPOD en estos escolares a nivel nacional fue de 3,6 % ⁴, de los resultados obtenidos se concluyó que existe una diferencia evidente entre la población rural y urbana, en cuanto a la

experiencia de caries registrada en el 2012-2014, el MINSA reportó que existe un 85.6% de prevalencia de caries a nivel nacional, esta patología está relacionada al nivel social y económico, falta de higiene oral, ausencia de una dieta balanceada, ingesta excesiva de fluoruros y falta de acceso a los servicios de salud.^{4,5}

La caries es una enfermedad que aqueja nuestro país y el *Streptococcus mutans* es uno de las principales bacterias que están relacionados a esta. Aunque se han realizado diversos estudios y muchos avances, es necesario continuar con nuevas investigaciones con respecto a este agente, para poder desarrollar nuevas técnicas y métodos, para el control temprano de la caries y así restablecer el equilibrio perdido que se ha generado. Para disminuir la prevalencia de caries, se necesita una mejor comprensión del papel de los microorganismos en las enfermedades dentales. Las técnicas nuevas, una de ellas la biología molecular ha servido para la identificación y caracterización de este agente.⁶

A lo largo de la historia se utilizó la medicina herbolaria, como un sustituto de fármacos o como un complemento del uso de fármacos y medicina natural. Se utilizan frutos, hojas y arbustos, etc., para la preparación de extractos que son utilizados para mejorar el estado de salud.⁷ La Organización Mundial de la Salud (OMS) manifiesta que la medicina herbolaria abarca: hierbas, material herbolario, preparaciones herbolarias y productos herbolarios, que contienen como principal activo, partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinación de estos.⁸ El consumo de estos productos está establecido y reconocido como inocuo y eficaz. En provincias del Perú recurren a la medicina

natural, por ser fácilmente accesible, de menos costo y por creer que es más efectivo.

La *Punica granatum* o comúnmente denominada granada, posee componentes bio activos y efectos beneficiosos para la salud humana, por lo tanto, este fruto ha sido interés, para investigaciones y próximas investigaciones, se ha comprobado en estudios in vitro que el árbol de la granada, el fruto y sus productos derivados contienen propiedades que pueden servir para la prevención de enfermedades y mantenimiento de una buena salud a un costo más accesible.⁹

Debido a trabajos de investigación referentes a la *Púnica granatum* (granada) se han detectado diversas propiedades uno de ellas, es que actúa como antioxidante la cual es utilizada en la industria alimentaria y farmacológica. Los estudios e investigación referente a esta se realizaron en diversas partes del árbol de este fruto, entre las propiedades de interés para esta investigación es que actúa como antimicrobiano. Pocos son los estudios de este fruto en el área de la odontología, por tal motivo abordaremos la investigación en base al extracto de *Punica granatum* en relación con *Streptococcus mutans*, la presencia del compuesto fenólico en la granada se relaciona con las propiedades antimicrobianas, que se ve en el estudio in vitro de los extractos.⁹

El objetivo a corto plazo es desarrollar nuevas técnicas que ayuden en la práctica clínica, también en la detección temprana de la caries a un costo menor y con alta especificidad, de tal manera se generaría beneficio para las personas o para la realización de programas prevención.¹⁰

La medicina natural ha sido utilizada desde la antigüedad, como medicina alternativa para curar enfermedades, dando lugar a los fitofármacos y es reconocida por su bajo costo y su bajo índice de toxicidad, en comparación con otros productos.¹¹

En base a lo referido, el objetivo de esta investigación, será la evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de Punica granatum (granada) sobre el Streptococcus mutans ATCC (25175) en este sentido se brindará la oportunidad que, a partir de un producto natural más económico, como lo son la medicina herbolaria, buscar alternativas terapéuticas más económicas como la Púnica granatum y que sean accesibles a la población siendo este el propósito de esta investigación.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema principal

- ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de púnica granatum (granada) sobre el crecimiento de Streptococcus mutans (ATCC25175)?

1.2.2 Problema específico

- ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)?
- ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)?

- ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)?
- ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)?
- ¿cuál el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) en sus diferentes concentraciones a las 24, 48 y 72 horas?

1.3. Objetivo de la investigación

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) sobre el crecimiento de Streptococcus mutans (ATCC 25175).

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175).
- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175).
- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175).

- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 100% sobre la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).
- Comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) en sus diferentes concentraciones a las 24, 48 y 72 horas.

1.4. Justificación de la investigación

Está basada en la búsqueda de un medio natural como la *Punica granatum* que sirva como un profiláctico oral. La medicina tradicional es utilizada mundialmente desde tiempos remotos y ha ido tomado mayor relevancia en las últimas décadas. En los países subdesarrollados la medicina tradicional a menudo es el único modo de tratamiento accesible y de menor bajo costo. El Programa Nacional de Medicina Complementaria del Perú y la Organización Panamericana de Salud hicieron una comparación de la medicina complementaria con la medicina alopática en clínicas y hospitales que trabajan dentro del Sistema de Seguro Social del Perú (EsSalud) llegando a la conclusión, que la medicina alternativa es más económica y tiene una baja tasa de repercusión a largo plazo, por ello, es viable el uso de esta medicina alternativa.¹²

El *Streptococcus mutans*, es el fundamental factor etiológico de la caries, causa la desmineralización de la estructura dental inorgánica. También puede colonizar las superficies dentales y participa en la formación de placa, por estas características se ha visto necesario realizar investigaciones para desarrollar agentes antibacterianos alternativos de fuentes naturales con un enfoque, para la eficacia en el tratamiento y prevención de la caries.^{13, 14}

La investigación tiene como fin evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* sobre los *Streptococcus mutans*. Una de las concentraciones de extracto determinara cual es la más idónea para la realización de profilácticos orales en un futuro.¹⁵ La *Punica granatum*, es ampliamente reconocida por su variedad de efectos terapéuticos y propiedades que en la presente investigación daremos a conocer, siendo el costo, relativamente bajo y disponible en la mayoría de los países. También se ha documentado que la granada tiene una toxicidad mínima y efectos adversos.¹⁵ De los resultados obtenidos en esta investigación seria de mucha ayuda para futuras investigaciones ya que no hay suficientes estudios disponibles sobre el efecto antibacteriano en microorganismos cariogénicos específicamente en el *Streptococcus mutans*.

1.4.1. Importancia de la investigación

Teóricamente tendrá una relevancia importante, debido a la información valiosa resultante. Actuando, así como una propuesta terapéutica en base a la cascara de *Punica granatum* (granada) cuya fruta presenta muchas propiedades que se dan a conocer a lo largo de esta investigación y mediante el extracto obtenido de esta fruta veremos el efecto que esta produjo en la bacteria *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Por otro lado, hablando socialmente, este estudio beneficiará a la población de todos los niveles socioeconómicos, ya que de comprobarse el efecto antibacteriano de la *Punica granatum* en el porcentaje ideal, se podrá utilizar como un producto profiláctico en la cavidad bucal que es natural, económico y

de fácil adquisición, para programas de prevención a gran escala dirigidos por las autoridades correspondientes.

Así mismo, quedará como antecedente para futuras investigaciones, en base a este fruto poco investigado, dejará una información valiosa a los futuros investigadores en busca de métodos alternativos para combatir la caries, e inclusive se puede ampliar a ramas de la medicina.

1.4.2. Viabilidad de la investigación

- Existen la infraestructura adecuada en el laboratorio central de la universidad Alas Peruanas.
- Esta investigación será autofinancia.

1.5. Limitaciones del estudio

- Poca información acerca del efecto antibacteriano de *Punica granatum* en *Streptococcus mutans*.
- Mantenimiento de la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- Autorización para emplear las instalaciones del laboratorio de microbiología de la universidad Alas Peruanas.
- Disponibilidad de tiempo del personal técnico del laboratorio.
- Obtención de la fruta por no estar en temporada.

CAPITULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Antecedentes internacionales

Farnaz H, Elham M, et al (2016) Irán. El propósito de este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum*, en *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus* y *Enterococcus faecalis*. Materiales y métodos, se preparó extracto de *Punica granatum* usando cascara en polvo y como disolvente se utilizó el etanol y agua. El crecimiento del halo de inhibición se determinó mediante la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto. En los resultados el extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* tuvo efectos inhibidores sobre las cinco cepas bacterianas con efecto máximo sobre *Streptococcus mutans* con MIC y MBC de 3.9 mg / mL. El halo de inhibición del más grande perteneció a *Streptococcus sanguinis* y el más pequeño a *Enterococcus faecalis*. La ampicilina y la clorhexidina tuvieron el mayor efecto inhibitorio sobre *Streptococcus sanguinis*. El extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* tuvo un efecto antibacteriano significativo en los patógenos bacterianos orales comunes, siendo su mayor efecto en *Streptococcus mutans*, que es uno de los principales agentes responsable de la placa bacteriana y la caries.¹⁶

Zandiswa G, Mrudula P (2016) South África. Buscaron determinar el efecto de la cáscara de la fruta de *Punica granatum* sobre la formación de biopelículas, la producción de polisacáridos (EPS) extracelulares y ácidos en *Streptococcus mutans*. Se preparó el extracto con cáscaras de *Punica granatum*. La

concentración mínima bacteriana (MBC), determinó el efecto sobre la producción de ácido, la formación de biopelículas y la producción de EPS. En los resultados, La concentración mínima bacteriana más baja fue de 6.25 mg / mL. El extracto *Punica granatum* inhibió significativamente la producción de ácido ($p < 0.01$). Después de 24 horas, redujo significativamente la formación de biopelículas en un 91% y 65% respectivamente ($p < 0,01$). El extracto de *Punica granatum* no inhibió la producción de EPS soluble en la biopelícula ni en el crecimiento planctónico. Sin embargo, redujo significativamente el EPS insoluble en la biopelícula y la forma planctónica ($p = < 0.01$) de *S. mutans*. El extracto de *P. granatum* mató a *S. mutans* cariogénicos en altas concentraciones. A concentraciones sub-bactericidas, redujo la formación de biopelículas, la producción de ácido y EPS. Esto sugiere que el extracto del fruto de la granada tiene el potencial de prevenir la caries dental.¹⁷

S. Aravindraj, M. Preethi (2017) India. El objetivo de este estudio es evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de *Punica granatum* sobre 5 cepas: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis* y *Cándida albicans*. Materiales y métodos, se utilizó las la cascara, arilos, semillas y epicarpio de las cuales se obtuvo el extracto en concentraciones de 10 mg/ml, como control positivo utilizo eritromicina como antibiótico estándar y ketonozol como antifúngico estándar. Se utilizó el método de difusión en disco, para cada disco se colocaron 10 ul usando una micropipeta. Resultados se midieron la zona de inhibición y se calcularon las medias de los resultados, en el análisis estadístico se analizó las comparaciones múltiples mediante la prueba de TUKEY POST HOC TETS, se demostró en los

resultados, que el extracto de cascara de granada tubo mayor efecto inhibidor con una media de 20 mm, seguido del epicarpio, en último lugar los arilos y las semillas. ¹⁸

Grazielle M, (2017) Tailandia. El objetivo de este estudio evaluó el efecto antibacteriano in vitro del gel de Punica granatum contra Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis y Lactobacillus casei: El extracto de Punica granatum se disolvió en Agua a 500 mg / mL. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se utilizó para la identificación y cuantificación de sustancias químicas. Marcador de punicalagina. Concentración bactericida mínima (MBC) y el ensayo de tiempo muerto (TKA) fueron investigados la actividad antibacteriana del gel de Punica Granatum y la clorhexidina al 2%. Los resultados de HPLC mostraron presencia de punicalagina a $2023.58 \pm 2\text{weh}5.29 \mu\text{g} / \text{mL}$ en el extracto de Punica granatum y a 0,234% (p / p) en el gel de Punica granatum formulado. El MBC para Streptococcus mutans, Streptococcus Sanguinis y Lactobacillus casei fueron 250, 125 y 500 mg / mL respectivamente. El TKA de 500 mg / mL de extracto de Punica granatum mostró una inhibición total de Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis y Lactobacillus casei a las 0, 1, 6, 8,12 y 24 horas de tiempo de contacto respectivamente. En Conclusión, el gel de Punica granatum equivale a 0.234% de punicalagina este Inhibió al Streptococcus mutans y Streptococcus sanguinis, pero no Lactobacillus casei dentro del período de incubación de 24 horas y tiene el potencial de ser Utilizado para la prevención de caries.¹⁹

Hemani K, Gheena.S (2018) India. El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de extracto de semillas y cascara de Punica

granatum sobre 8 especies. Se realizó por el método de difusión de disco, cada disco contenía 50 ul del extracto, la actividad antimicrobiana se realizó sobre: Streptococcus salivarius, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis, Streptococcus mitis, Streptococcus aureus, Lactobacillus acidophilus y Actinomyces viscosus, como grupo control se utilizó ciprofloxacina (10 ug/ml). Resultado se observó mayor actividad antimicrobiana en el extracto de cascara de granada que en el extracto de semillas de granada. El extracto de cascara de Punica granatum cuyos solventes fueron, acetato de etilo, nbutanol, cloroformo y metanol mostraron actividad antimicrobiana entre los 8 microorganismos, pero tuvieron mayor actividad inhibitoria en Streptococcus mutans, siendo el mayor halo de inhibición con el solvente cloroformo 18.5 ± 0.4 , también en Streptococcus sanguinis Staphylococcus aureus, Lactobacillus acidophilus y actinomyces viscosus. El extracto de cascara de Punica granatum contiene biomoléculas activas contra importantes patógenos microbianos orales y, por lo tanto, promete ser efectiva contra la caries dental.²⁰

Sanket k, Nikita k (2018) India. El objetivo de referente es evaluar el efecto antimicrobiano del extracto de cáscara de granada sobre Streptococcus mutans y Lactobacillus, Hiora y clorhexidina. Materiales y métodos: en este estudio, se utilizó clorhexidina al 0,12% como grupo control y como grupo de prueba se utilizó Hiora (enjuague bucal a base de hierbas) y extracto de cascara de granada en concentraciones de 75 % y 100%, se cultivaron en placas de agar sangre. Se utilizó el método de difusión de agar con disco. Resultados del efecto antimicrobiano sobre Streptococcus mutans: el extracto de cascara de granada al 100% obtuvo una media 17.47 ± 0.551 , el extracto de cascara de granada al

75% obtuvo una media de 17.31+/-0.551, la media de clorhexidina fue 15.92+/-0.601. Conclusión: El extracto de cáscara de granada muestra efecto antimicrobiano y, por lo tanto, pueden reemplazarse para inhibir el crecimiento de microorganismos orales.²¹

Antecedentes nacionales

Bernal S, et al (2015) Realizaron un estudio y el objetivo fue saber si el extracto hidroalcohólico de cascara de *Punica granatum* (granada) afecta en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomona aeruginosa*. El fruto de *Punica granatum* fue recolectado en el distrito de Chao (la Libertad- Perú), se obtuvo el extracto hidroalcohólico de la cascara de *Punica granatum* (granada) en concentraciones de 0.98, 1.95, 3.91, 7.81, 15.63, 31.25, 62.5 mg/ml y las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomona aeruginosa*, el crecimiento inhibitorio se determinó por la escala de Mac Farland se utilizó como grupo control positivo un disco de gentamicina y como control negativo, agua destilada. Se obtuvo como resultado que a mayor concentración de extracto de cascara de *Punica granatum* el halo de inhibición aumento en la cepa de *Streptococcus aureus* y la *Pseudomona aeruginosa* presento menor inhibición. Se concluyó, que el e extracto hidroalcohólico de granada actúa mejor en Gram positivos que en Gram negativos.²²

Ramos A (2017). Realizo una investigación cuyo objetivo fue saber si el extracto de *Punica granatum* (granada) tiene algún efecto antibacteriano sobre las cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Gram negativo. Para este estudio se utilizaron trece placas Petri que fueron inoculadas con *Aggregatibacter*

actinomyces comitans las concentraciones de extracto hidroalcohólico de Punica granatum (granada) fueron (40%,50%,70%y 90%), se midió el crecimiento de los halos de inhibición a las 24, 48y 72 horas. En los resultados se observó que las concentraciones de 50%,70%y 90% tuvieron mayor halo de inhibición. se concluyó en cuanto al tiempo de exposición a las 24 horas se tiene la visualización de mejores resultados de los halos de inhibición, teniendo una medida de 21,30 milímetros.se demostró que el mejor halo de inhibición se observa a las 24 horas en una concentración de extracto hidroalcohólico de 90%.²³

Escobar F, Bernardita J (2017). Tras encontrarse pocos estudios empleando el zumo de Punica granatum “granada” que ha sido utilizada en la medicina tradicional., realizan el estudio para comprobar la actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo del Punica granatum. Para estas pruebas, se prepararon 4 concentraciones (200, 300, 400 y 500 mg/ml). Utilizando el método de Kirby Bauer o de difusión en agar, se midió la sensibilidad de los agentes bacteriano (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa) a las diferentes concentraciones del zumo, empleando de manera cualitativa la escala de Duraffourd. Resultando una sensibilidad intermedia para la Escherichia coli, así como para la Staphylococcus aureus, pero poco o nula actividad contra la Pseudomonas aeruginosa.²⁴

Álvarez L, Espinoza M (2018). Realizaron un estudio cuyo objetivo del presente estudio fue determinar si existe la diferencia del efecto antibacteriano del extracto etanólico de la Psidium guajava (guayaba) contra la Punica granatum (granada) sobre cepas de Streptococcus mutans. En los materiales y métodos se

obtuvieron concentraciones puras las cuales fueron maceradas siguiendo un proceso para obtener el 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100% con los extractos de *Psidium guajava* y *Punica granatum*, estos fueron reservados en un recipiente hasta su utilización. Se empleó el método de disco difusión en agar. Para la siembra se utilizaron 10 placas con agar Müller-Hinton mediante la técnica de difusión, utilizando el extracto etanólico de la *Psidium guajava* y *Punica granatum* en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% y 12,5% y se procedió a la incubación en microaerofilia a 37 °C, la medida de los halos de inhibición se vio a las 24 horas y 72 horas respectivamente. Comparando los tipos de extracto etanólico entre la granada obtuvo una media de 7.675 mm y una desviación estándar de 6.86 y la guayaba presentaron una media de 15.4 y una desviación estándar de 4.59 respectivamente, la diferencia de promedios entre los extractos los extractos, mostró diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Se concluyó que si existe diferencias entre el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Psidium guajava* (guayaba) y el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la *Punica granatum* (granada) sobre el *Streptococcus mutans* estudio in vitro. ²⁵

2.2 bases teóricas

2.2.1. Punica granatum

El fruto de granada, cuyo nombre científico es *Punica granatum*, corresponde a la familia Punicaceae, originario de Irán. En la actualidad, es cultivada de forma extensa en el continente asiático y africano, siendo este uno de los frutos de mayor exportación, el medio de cultivo propicio para el crecimiento de este fruto son las zonas áridas y semiáridas como el sureste de Asia y la zona mediterránea de África. Según los historiadores la granada fue traída por los misioneros españoles durante el periodo de la conquista de América, y logro habituarse en zonas principalmente secas y cálidas como los valles.⁹

En el Perú tradicionalmente fue cultivada en los Valles de Chilca y Huaral, por su facilidad para adaptarse a cambios climáticos bruscos. Comercialmente con fines de exportación son cultivadas en departamentos de Ica, La Libertad y Ancash.¹⁵

El fruto del *Punica granatum* (granada) se ha empleado desde tiempos remotos en la medicina herbolaria en enfermedades como: la acidosis, disentería, infecciones microbianas, diarrea, infección por helmintos, hemorragia y patologías respiratorias. Siendo utilizada a lo largo de los tiempos como medicina natural, esto ha llevado a diversas investigaciones de sus propiedades.²⁶

2.2.2. Características de la Punica granatum

La granada (*Punica granatum*) es un árbol que tiene 8 metros de altura como máximo. La fruta tiene un tamaño de unos 5-12 cm de grosor, presenta un aspecto hexagonal redondeada, piel gruesa rojiza, contiene aproximadamente 600 semillas y cada una de ellas envueltas por una pulpa cargada de agua (arilo)

que puede variar en color de blanco a rojo oscuro o púrpura, el arilo es la parte comestible de la fruta. Las semillas están incrustadas en una pulpa blanca, esponjosa y astringente.^{27, 28}

2.2.3. Composición de la *Punica granatum* (granada)

Unos de los aspectos importantes por lo cual se han realizado investigaciones en el transcurso de los años es porque contiene compuestos antioxidantes, como los fenoles y flavonoides (presente en la corteza y las raíces), polifenoles (presente en las flores), antiocianinas, elagitaninos (presente en la corteza, hojas y frutos y punicalagina (presente en las semillas) y los fenoles, flavonoides, taninos y ácido elágico (presente en la cascara, estos son caracterizados por ser antioxidantes potentes). Alrededor del 50% de peso del fruto corresponde a la cascara En Recientes investigaciones, se les han atribuido propiedades nutricionales y farmacológicas, el compuesto total de fenoles tiene un rango de 2.4 y 9.23 g/L de jugo, y las antiocianinas presentes un rango de 0,815 y 7, 760 gr/L.¹²

Se han detectado presencia de compuestos antioxidantes en casi todo el árbol granada y los más abundantes son los taninos y los flavonoides.

Nutrientes	Unidad	Valor por 100gr
PRINCIPIOS INMEDIATOS		
Agua	Gr	80,97
Energía	Kcal	68
Proteína	Gr	0,95
Grasa	Gr	0,30

Carbohidratos	Gr	17,17
Fibra dietética	Gr	0,6
Azúcares totales	Gr	16,57
VITAMINAS		
Vitamina C (ácido ascórbico)	Mg	6,1
Vitamina A	UI	108
Vitamina E (tocoferol)	Mg	0,60
Vitamina K (filoquinona)	Ug	4,6
OTROS		
Fitoesteroles	Mg	17
Colesterol	Mg	0
X Caroteno	Ug	50
b- caroteno	Ug	40

Fuente: Carbonel y Sánchez (2012) ⁵

Tabla N°1. Composición nutricional de la parte comestible de *Punica granatum*.

2.2.4. Principales componentes de la *Punica granatum*

a) Taninos

Los taninos se encuentran formando parte de la unidad en plantas. Estos se pueden encontrar en el tronco, corteza y mayormente en las hojas, los taninos tienen la propiedad de proteger alguna de las partes más débiles de la planta frente a la presencia de virus. Asimismo, estos inhiben el crecimiento de microorganismos frente al ataque microbiano y reaccionando a la descomposición orgánica, entre sus propiedades encontramos las

antiinflamatorias, esto es debido a su potencial de destruir radicales libres, también son antidiarreicas y actúa como cicatrizante.²⁹

b) Elagitaninos

Los elagitaninos contienen en dentro de su estructura ácido elágico y un poliol que generalmente es glucosa o ácido quínico; Los elagitaninos y el ácido elágico causan un efecto positivo sobre la salud esto lo debemos a las propiedades anticancerígenas, peroxidación lipídica, antioxidantes y actúa previniendo posible formación de tumores .²⁹

En estudios realizados el método analítico ha detectado que en el árbol *Punica granatum*(granada) posee antioxidantes específicamente en la corteza raíz hojas flores y el fruto (cascaras, jugos y semillas).²⁹

Se han realizado diversos estudios referentes a la función antioxidante de la *Punica granatum* (granada), dentro de ellos tenemos a shahid Lqbal (2008), quien obtuvo de la cascara de granada extracto de metanol. El extracto a través de un método de purificación fue agregado al aceite de girasol el cual fue sometido frente al aceite de butilhidroxi-tolueno BHT, para ver quien tenía mayor función antioxidante, el BHT es un antioxidante sintético que tiene un uso comercial en conservación de grasas y aceites. En los resultados obtenidos refiere que el extracto de cascara *Punica granatum* es un fuerte antioxidante de aceite de girasol muy similar al BHT. ²⁹

Singh (20002) señalo la eficacia de componentes antioxidantes sobre radicales peróxidos y en la oxidación de lipoproteínas de seres humanos de baja densidad (LDL). Los estudios se realizaron vía in vitro con extractos que siguieron un

método de purificación, resultado de extracciones realizadas con metanol, con agua y con acetato de etilo, obtenidas de cascara y semillas.²⁹

2.2.5. Consumos y usos de Punica granatum

En diversas partes del mundo, la demanda de su comercialización generalmente es para el consumo en refrescos, jugos, y también tienen usos en la medicina herbolaria. Sus aplicaciones en la medicina tradicional incluyen el uso de la corteza del árbol, hojas, flores, fruto, las semillas y la cascara.¹²

En la India, además de su aplicación en la medicina herbolaria, se utiliza como dentífrico y para la tinción de telas. Se aplica también en la fabricación de citrato de sodio y ácido cítrico, en la producción de bebidas refrescantes; también se utiliza en la elaboración de postres.¹²

2.2.6. Propiedades

a) Propiedades antioxidantes:

La presencia de antioxidantes ha sido encontrada en el jugo de la Punica granatum (granada). Este fruto contiene flavonoides (su consumo es favorable para prevenir de enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y otras) y antocianidinas (delfinidina, cianuración y pelargonidina) cuyo aceite de semilla y jugo muestra una actividad antioxidante. Los extractos de la cascara de Punica granatum (granada) exhiben actividad de eliminación contra los radicales hidroxilos y los aniones su peróxido, que podrían estar relacionados con las antocianidinas. La acción antioxidante de Punica granatum (granada) se observa, no solo a través de sus reacciones de eliminación, sino también por su capacidad para formar quelatos metálicos ^{30, 31,32}.

b) Propiedades anticancerígenas y antitumorales:

Son varias las investigaciones llevadas a cabo para la evaluación de la capacidad del fruto *Punica granatum* y sus productos, de los resultados obtenidos sabemos que posee una buena actividad antioxidante, actúa como un agente antiproliferativo, antiinvasivo y pro-apoptótico en células dañadas, entre autores que realizaron estos estudios tenemos a (Syed (2007); Hong (2008); Hamad y Al-Momene (2009). Afaq (2005), realizó una investigación aplicando extracto de *Punica granatum* (granada) como un pre tratamiento tópico en ratones que tenían tumores, reduciendo la incidencia de ellos de un 100 % a un 30 % amplificando también la latencia en el desarrollo del tumor desde 9 a 14 semanas.²⁷

Albretch (2004) realizó un estudio sobre el efecto que producía el aceite de *Punica granatum* (granada), utilizando los polifenoles encontrados en corteza y las membranas y polifenoles del jugo fermentado de granada sobre el cáncer de próstata. Estos agentes inhibieron la proliferación in vivo de células cancerígenas en células humanas de LNCaP, PC-3 y DU 145; teniendo como resultados la gran actividad antitumoral de estos productos derivados de la *Punica granatum* sobre el cáncer de próstata. Hong (2008) demostró que los extractos y jugos de la *Punica granatum* (granada) son increíbles inhibidores del crecimiento de células cancerígenas, siendo incluso más potentes que algunos polifenoles que son aislados; sugiriendo un efecto correlativo con los fitoquímicos que encontramos en la granada y sus extractos. Hay evidencias científicas que demuestran que el jugo de *Punica granatum* (granada) suprime la ciclooxigenasa 2 (COX-2).²⁷

Según Adams (2006) algunos de los componentes que encontramos en el jugo de granada, como antocianinas y flavonoides, pueden ser uno de los responsables del aumento de la actividad antiproliferativa de las células cancerígenas. El jugo de *Punica granatum* (granada), el ácido elálgico y la punicalagina estimularon la muerte celular (apoptosis) de las células HT-29 en el colón; sin embargo, en las células HCT116 del colón únicamente contribuyeron a la apoptosis el ácido elálgico y las punicalaginas y no el zumo de granada (Seeram 2005).²⁷

En todos los casos estudiados la *Punica granatum* es utilizada como método de prevención y parte del tratamiento, pero aún no se puede decir que lo cura por completo o elimina los tumores. La *Punica granatum* gracias a su composición fitoquímica es un fruto muy recomendado para la prevención del cáncer.²⁷

Principales efectos antitumorales de la granada:

- Antiproliferativo: evita la propagación del crecimiento de los tumores.
- Induce apoptosis: Muerte de la célula.
- Inhibe factor nuclear κ B (NF- κ B): regulación de los genes (sistema inmune, proliferación celular, invasión tumoral, metástasis).
- angiogénesis: Evita la formación de nuevos vasos sanguíneos de las estructuras cancerígenas.

c) Prevención de enfermedades cardiovasculares:

Se ha realizado estudios en animales, humanos y diferentes componentes de la *Punica granata* y cómo esta actúa en la prevención y disminución de aterosclerosis y la LDL oxidada; Aviram (2000); Sezer (2007); Basu y Penugonda (2009); Davidson (2009); estos autores analizaron el efecto que producía la ingesta de jugo de *Punica granatum* (granada) en hombres sanos sobre la LDL

oxidada y se determinó que el LDL disminuyó la progresión de aterosclerosis y bajo el aumento de la actividad del HDL en un orden del 20 %.²⁷

De los diferentes estudios realizados el investigador y doctor Aviram suministró jugo de *Punica granatum* (granada) a pacientes sanos e hipertensos por periodos de tiempo determinado (2 semanas), como resultado se ha visto la reducción de la presión arterial hasta en un 36 %, esto ha sido atribuido a la actividad de los polifenoles.²⁷

d) Propiedades antiinflamatorias:

La *Punica granatum* ha demostrado inhibir la inflamación por diferentes mecanismos. La ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX), que son enzimas clave en la transformación del ácido araquidónico en prostaglandinas y leucotrienos (mediadores de la inflamación), respectivamente, son inhibidas por extractos de *Punica granatum* (granada). Según Tomás-Barberán (2010) los extractos de semillas de *Punica granatum* también inhiben a algunos mediadores de la inflamación.^{33, 27}

Larrosa (2010) demostró que la administración de extracto de *Punica granatum* disminuyó los niveles de prostaglandinas en la mucosa del colon en ratas esto se debió a la presencia de ácido elágico en la *Punica granatum*; así mismo Hollebeeck (2012) determinó que el extracto de cascara de *Punica granatum* tiene propiedades antiinflamatorias (punicalagina) ²⁷

e) Propiedades contra la diabetes Mellitus:

Es una enfermedad sistémica que afecta a muchas personas a nivel mundial y es causante de muerte.

En el jugo de *Punica granatum* (granada) encontramos compuestos fenólicos (antocianinas) que confieren por estudios realizados propiedades hipoglucemiantes contra la diabetes; estos compuestos inhiben absorción de la glucosa en el intestino o tejidos periféricos. Entre los mecanismos para la reducción de la diabetes tenemos la inhibición de la enzima glucosidasa y la inhibición de la glucemia a través de la absorción en los tejidos periféricos y no por la absorción del intestino.²⁷

f) Actividad antimicrobiana

Contra diversos microorganismos incluidos las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

2.2.7. Efectos de la *Punica granatum* sobre *Streptococcus mutans* y la cavidad oral sobre la salud bucal:

La *Punica granatum* (granada) también ha demostrado efectividad en el control de la inflamación oral, así como en el recuento de bacterias y hongos en las enfermedades periodontales y en la estomatitis de la prótesis asociada a *Candida*. Se ha encontrado que *Punica granatum* (granada) tiene propiedades antibacterianas contra las bacterias orales, esto incluye a *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (MRSA) y *Staphylococcus aureus* sensible a la metilina (MSSA).^{34, 35}

Se ha encontrado que los taninos inhiben la alfa-amilasa salival, esta cataliza la hidrólisis del almidón a los oligosacáridos y se une a los *Streptococcus* y al esmalte, por tanto, este proporciona protección frente a los microorganismos cariogénicos.

Tener una buena higiene oral no es solamente para proyectar una buena estética es importante, para mantener la funcionabilidad de los dientes; también esto nos protege para la aparición de enfermedades periodontales y enfermedades cardiovasculares. Según Dumitresco (2005), es de conocimiento que la aparición de enfermedad periodontal crónica está relacionada íntimamente con la progresión y agravamiento de enfermedades cardiovasculares.²⁷

Di Silvestro (2009) realizó una investigación con un enjuague bucal con extractos de *Punica granatum*(granada) concluyendo que este reducía los microorganismos presentes en la placa dental. Esto es atribuido a los compuestos polifenólicos y flavonoides presentes en la granada sobre el desarrollo de la gingivitis.²⁷

2.2.8. Método para evaluar la actividad antimicrobiana

Existen diferentes métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), la eficacia antimicrobiana y la evaluación del espectro antimicrobiana; el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS), conocido como el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI); ha elaborado guías estandarizadas las cuales son muy utilizadas, para realizar prácticas in vitro en el laboratorio, estos métodos utilizados tienen resultados muy exactos y se caracterizan por su reproducibilidad y repetibilidad.^{36,37}

A continuación, unos de los métodos más utilizados:

Método de difusión en agar

La National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda la utilización del método de disco o Kirby Bauer que es una de las técnicas más usadas por los laboratorios para la evaluación de la susceptibilidad de los

microorganismos en presencia de los antimicrobianos. Este método consiste en la distribución de la sustancia antimicrobiana en un medio de cultivo por ejemplo el Agar que ha sido inoculado previamente con un medio de cultivo puro. En este método lo más representativo es la inhibición del halo ya que nos muestra la sensibilidad de los microorganismos frente a la sustancia antimicrobiana. El halo de inhibición se relaciona con la concentración más baja del extracto que inhibe el microorganismo estudiado. Por lo tanto, a mayor zona de inhibición, más bajo será la concentración de agente antimicrobiano requerido para impedir la proliferación de los microorganismos. Aunque, se debe tener en cuenta que la formación del halo alrededor del disco depende de la concentración de antibiótico y su capacidad de difundirse en un medio de cultivo (agar).³⁶

Según Pellecuer, el método por difusión de agar es uno de los que se utilizados más en investigación in vitro, tiene la desventaja frente a microorganismos de crecimiento lento.^{36,38}

b) Métodos de dilución en caldo

Se realiza con dispersión de las muestras en concentraciones puras de la sustancia antimicrobiana con el inóculo, existen varias concentraciones de la sustancia antimicrobiana (generalmente son diluciones dobles seriadas) en un medio líquido de formulación preestablecida. Existen dos métodos: macrodilución en caldo cuyo volumen es expresados en ml y microdilución en caldo se denomina así porque se emplean volúmenes limitados. Posteriormente estas muestras serán analizadas luego de haber sido incubado a 35 °C por 24 horas y se obtendrá la concentración mínima inhibitoria (CMI) del agente frente a la instancia de prueba.^{36,39}

una de las ventajas de este método es su efectividad es la reproducción, rapidez y facilidad para estandarizar muchas muestras; como también en posibilitar su uso en el estudio del agente antimicrobiano en una muestra soluble en agua o insoluble como los aceites esenciales.³⁹

2.2.9. Streptococcus mutans y caries dental

La microbiota oral está compuesta por una gran cantidad de especies microbianas, algunas de estas bacterias están implicadas en enfermedades de la cavidad oral entre las más comunes encontramos la caries y la enfermedad periodontal. La boca se encuentra colonizada por varios microorganismos incluso antes de la erupción dentaria (decidua). Con la erupción dental, la superficie de los dientes sirve como un medio de anclaje para que se desarrolle la placa dental que se encuentra cubierta por una biopelícula dental duradera.^{6,40}

La microbiota tiene un ecosistema donde habitan principalmente comensales (de los miles de bacterias, el 60% de estas son cultivables) pertenecientes entre 500 y 700 especies, que se encuentran en las mucosas y los dientes donde se forman la placa bacteriana o biofilm, en mayor cantidad encontramos al género Streptococcus.⁶

Los estreptococos forman el mayor número de población bacteriana que se encuentra en el biofilm dental. Gran cantidad de los estreptococos encontrados han sido identificados como especies de: Streptococcus mutans, Streptococcus sanguis, Streptococcus mitior, Streptococcus salivarius, y Streptococcus milleri. Entre las especies estreptocócicas de mayor población encontramos al Streptococcus sanguis y Streptococcus mutans que tienen predilección por

colonizar sitios particulares de la boca como las superficies de dientes y aparatos prostéticos.⁶

Los *Streptococcus mutans* son los microorganismos más importantes de la caries dental y su patogenidad ha demostrado su relación con la caries de esmalte, debido a su capacidad de producir ácidos a partir de la sacarosa.^{6, 41}

Morfología de los *Streptococcus mutans*

Bacterias de forma redonda (coco) de características gran positivo, adaptado en cadena, anaerobios facultativos en la mayoría de su especie, con poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, con un rápido metabolismo de la glucosa, lactosa, entre otros y productor de ácido α -hidroxi-propanoico (ácido láctico), con capacidad fermentador consiguiendo un Ph crítico para el medio oral, en muy corto tiempo. El *S. mutans* se subclasifica en diferentes tipos, según su propiedad inmunológica, biológicas y genéticas, siendo el de serotipo "C", el más interviniente en la producción de caries. El *Streptococcus mutans* se encuentra principalmente en el ecosistema oral, especialmente para su colonización requiere de tejido duro no escamativo. Su obtención para su aislamiento e identificación es a partir de muestras de placa dental o de la saliva.⁶

2.2.10. Medios de cultivo

Aún existen dificultades técnicas para la correcta obtención de muestras representativas, y poder aislar y calcular la cantidad de microorganismos. Existiendo una gran variedad de medios de cultivos, dependiendo del requerimiento del estudio, el medio más utilizado para el aislamiento del *S. mutans* es el agar mitis salivarius suplementado con bacitracina 0,2 U/ml y sacarosa al 20 %. Este agar permite identificar las características morfológicas

de las colonias del *S. mutans*, siendo de un tono blanquecino con bordes definidos, y fuertemente adherentes al medio.

En la cultivación se requiere de un ambiente con 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por un par de días, seguido de dos días para la incubación.⁶

2.2.11. Aparición del *Streptococcus mutans* en el ecosistema oral

Siendo los *S. mutans* el principal agente interviniente para la formación de caries dental. Siendo este microorganismo estable en la cavidad oral, después de la erupción dental, debido a su adherencia al tejido duro para su prolífera colonización. La evidencia demuestra que la principal fuente de transmisión del *Streptococcus mutans* a temprana edad es por la saliva de la madre, donde diferentes estudios han demostrado el patrón de ADN cromosomal idéntico en los microorganismos oral de los infantes a la de sus madres. Donde esta colonización se denomina "ventana de infección", que ocurre en los primeros años de vida.

El *Streptococcus mutans* tiene la peculiaridad de la persistencia de sus fenotipos (c, e, f y k) en cavidad oral después de la erupción dental. El microorganismo logra una estabilidad relativa en el ambiente oral del hospedador, llamado persistencia intraindividual a este fenómeno, donde la interrelación entre los distintos fenotipos le da más oportunidades de supervivencia, adhiriéndose entre sí y con otros organismos formando biopelículas para su prolífera colonización, soportando así variaciones del Ph.

Se considera que la colonización de los *S. mutans* en infantes en después de la erupción de los primeros dientes deciduos, sin embargo, el *S. mutans* y el *S.*

sobrinus tienen la capacidad de colonizar en superficies lábiles como la mucosa, quizás por eso se deba a que algunos niños presentan lesiones cariosas en breve después de la erupción de los dientes.⁶

2.2.12. Adherencia de Streptococcus mutans

Las glucosiltransferasas (polisacarido) de la bacteria desempeñan un papel importante en el desarrollo de la placa dental a partir de la sacarosa, estas producen glucanos, que son las responsables de la adherencia bacteria, gracias a las ramificaciones del mutano y de los enlaces alfa, estas crean la adherencia perfecta a la superficie lisa del esmalte, pero a su vez también crea unión con otras bacterias (adherencia y co-adherencia), logrando así persistencia y endurecimiento de la placa dental. Los glucanos también son fuente de nutrición gracias a la síntesis de enzimas gluconohidrolasas, que son sintetizadas por las bacterias.

2.3. Definición de términos básicos

Streptococcus mutans:

Streptococcus del grupo viridans, es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, dispuestos en cadena, no móvil que se encuentra en la cavidad oral, forma parte de la placa dental o biofilm dental. Está asociado al iniciación y progresión de la caries.⁴²

Punica granatum:

Punica granatum, comúnmente conocida como granada, es un miembro de la familia monogenerica, Punicaceae. Se trata de una especie leñosa, arbustiva o arbórea que puede alcanzar de 2 a 5 metros de altura, generalmente espinoso, de tronco a menudo tortuoso y corteza de color pardo grisáceo.⁹

Extracto:

producto sólido o espeso muy concentrado que puede ser obtenido de fruta, planta, semillas o animales en diferentes procedimientos.

Agar:

Es un polímero que es extraído de cartílago, Gracilaria Confervoides que es un tipo de algas roja; es una sustancia mucilaginosa que se funde a aproximadamente a 100°C y se solidifica en un gel a aproximadamente a 10°C; No es digerido por la mayoría de las bacterias y es una fuente de gelificación que puede ser usado en materiales de impresión dental y como medio de cultivo sólido para microorganismos.⁴³

Concentración mínima inhibitoria:

Es la medición de la sensibilidad de una bacteria frente a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano, capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normales. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (puras) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias.³⁹

Concentración mínima bactericida:

Es la cantidad mínima de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.³⁹

CAPITULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Formulación de hipótesis y derivados

Hipótesis principal

- El extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Hipótesis específicas

- H1: El extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 25% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- H2: El extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 50% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- H3: El extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 75% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- H4: El extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 100% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- H5: El efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* en sus diferentes concentraciones es diferente a las 24, 48 y 72 horas.

3.2. VARIABLES

Variable dependiente:

Efecto antibacteriano

Variable independiente:

Extracto etanólico de *Punica granatum*

3.2.1. Definición conceptual de variables

Efecto antibacteriano:

Es el efecto de inhibir el crecimiento bacteriano.

Extracto etanólico de Punica granatum:

La Punica granatum (granada) presenta muchas propiedades y el extracto de esta fruta tiene la capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias.²⁷

VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	VALORES
Efecto antibacteriano	Inhibición del crecimiento bacteriano	Halos de inhibición del crecimiento bacteriano KIRBY BAUER	Razón	Escala de duraffourd: 0-8 mm nula (-) 8-14mm sensible (+) 14-20 mm muy sensible (++) 20+mm sumamente sensible (+++)
Extracto etanólico de Punica granatum (granada)	Cantidad Porcentual del extracto	Concentración <ul style="list-style-type: none">• 25%• 20%• 75%• 100%	Razón	%

CAPITULO IV: METODOLOGÍA

4.1. Diseño metodológico

El estudio es de tipo **experimental In vitro, prospectivo, transversal y aplicativo.**

Experimental: Porque investigador controla la acción de una variable sobre otra, lo que permite que se modifiquen las variables en intensidad, pudiendo evaluar las causas y resultados existiendo controles positivo y negativo.

In vitro: Porque el estudio se realizó en el laboratorio central de la Universidad Alas Peruanas que se encuentra en el local en valle Hermoso Surco.

Prospectivo: Porque la recolección de datos se dará a través del tiempo al iniciarse la exposición de la causa hasta determinar o no la aparición del efecto.

Transversal: Debido a que el estudio se realizara en un periodo determinado, y las variables serán observadas inmediatamente después de realizado el cultivo.

Aplicativo: Esta investigación se llevará a cabo mediante la manipulación de cepas de cultivo de Streptococcus mutans (ATCC 25175). Los resultados podrán tener aplicaciones beneficiosas en la población.

4.2. Diseño muestral

La unidad de análisis para el presente estudio son placas Petri con inóculos de Streptococcus mutans (ATCC 25175) y extracto etanólico de Punica granatum (granada) en sus diferentes concentraciones, para este estudio utilizaremos concentraciones de 25 %50%, 75%y 100% respectivamente.

La investigación se realizará con medios de cultivo agar tripticasa soya (TSA) y agar Miuller Hinton y cepas ATCC 27175 los cuales serán obtenidos de laboratorio GenLab del Perú S.A.C.

La muestra estará conformada por cepas *Streptococcus mutans* (ATCC 25125), que generalmente lo encontramos en la cavidad oral que cumplen los criterios de inclusión y exclusión de la investigación.⁶

Muestra

La muestra fue seleccionada de forma no probabilística, de forma conveniente para la investigación y considerando los criterios de inclusión y exclusión, sin aleatorización equitativa; se utilizarán 44 placas Petri.

Serán considerados los siguientes grupos:

Grupo 1: concentración 25%. (10 placas)

Grupo 2: concentración 50%. (10 placas)

Grupo 3: concentración 75%. (10 placas)

Grupo 4: concentración 100%. (10 placas)

Grupo control: clorhexidina 0.12% (4 placas)

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Cepas de *Streptococcus mutans* (ATTC 25175) en contacto con el extracto de *Punica Granatum* (granada).
- Placas Petri que después del proceso de incubación no presenten contaminación por otros microorganismos.
- Muestra de extracto etanólico de granada en concentraciones de 25%,50%,75% y 100%

Criterios de exclusión:

- Placas Petri que después del proceso de incubación mostraron Contaminación por los otros microorganismos. Se observa la presencia de colonias que no sean *Streptococcus mutans* (ATTC25157).
- Placas Petri con defectos

4.3. Técnicas e instrumentación de recolección de datos**Recolección de datos**

Se utilizará la Ficha de recolección de datos (anexo 01)

PROCEDIMIENTO**Obtención del permiso para realizar la investigación.**

Se enviará una solicitud para obtener la autorización de la Dirección de Estomatología y hacer uso del laboratorio central de la universidad Alas Peruanas que se encuentra en el local de Jr. Pedro Ruiz Gallo 251, Pueblo Libre, bajo la supervisión de la encargada Blga. Da pozo. (Anexo 02).

Procedimiento**Obtención del extracto etanólico**

Lo primero a realizar fue la clasificación taxonómica de la *Punica granatum* (granada), que fue realizada por la Dra. Joaquina Albán Castillo jefe del herbario san marcos (USM) la cual se llevó a cabo en el museo de historia natural (anexo 03).

La *Punica granatum* (granada) fue recolectada en la localidad de Santa cruz que se encuentra ubicada en la provincia de palpa, región de Ica, lugar caracterizado por la exportación de granada.

Obtención del microorganismo

Se llevó a cabo el pedido de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en el laboratorio GenLab Perú S.A.C.

Obtención del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada)

Realizada en la universidad Nacional Mayor de San Marcos facultad de farmacia y bioquímica por el Dr. Cesar M. Fuertes Ruitón.

Se pesó 3 kl de Granada, se procedió a retirar la pulpa dejando solo la cascara, luego se procedió a secar la muestra en una estufa de aire circulante a 38° C, obteniendo un peso de 320 gr de cascara seca, luego se realizó la molienda de la muestra en un molino manual. Se añadió 900 ml de etanol y se dejó macerar en un frasco ámbar por 5 días. Pasado el tiempo se filtró y se procedió a eliminar el solvente en un rotavapor, obteniendo un volumen final de 35 ml.

Para determinar la cantidad de sólidos en la muestra se tomó 250 uL en una placa porta objetos y se colocó en la estufa por 48 horas, obteniendo así un peso final de 253 mg, calculando así la concentración de 1 mg/uL, el extracto debió ser conservado en refrigeración^{45.45}.

Activación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Para la activación de la cepa se procedió a abrir el envase sellado que contenía un tubo color naranja, donde se encontraba la cepa de *Streptococcus mutans* inactiva en un estado liofilizado en un extremo, al otro extremo encontramos el líquido hidratante y un hisopo para la inoculación del mismo, para activar la cepa se presionan ambos extremos del tubo para así obtener la cepa diluida. Una vez activada la cepa de *Streptococcus mutans* fue cultivada en 5 placas Petri con agar tripticasa de soya TSA enriquecida sangre.

Se utilizó 5 placas de agar (TSA), para la obtención de colonias de *Streptococcus mutans*, el contenido de agar TSA fue 4 gr por placa, se procedió a pesar 20 gr en la balanza analítica, el contenido se colocó de un papel filtro, una vez obtenido el peso exacto se llevó el contenido a un matraz que contenía 100 ml de agua destilada y se procedió a mezclar, luego fue llevada al horno microondas por el rango de 1 minuto, una vez disuelto tendrá que tener un color translucido, procedemos a sellar la boca del matraz con papel Graf para ser colocado en la autoclave por 1 hora hasta que alcance (121 ° X 15 ml), llevamos a un proceso de enfriamiento, para poder ser manipulado, luego colocamos el contenido en las placas.

Inoculamos las placas de agar TSA y sangre con el hisopo que contenía la sepa de *Streptococcus mutans* con el fin de obtener colonias nuevas, las placas inoculadas fueron llevadas a la incubadora a 37°C por 24 horas.

Transcurrido 24 horas se observaron colonias nuevas en las placas, después fueron llevadas a tubo de ensayo que contenía solución salina NaCl al 0,8% la dilución se realizará para lograr una turbidez de 0,5 en la escala de Mac. Farland (1,5x10⁸UFC/ml).⁴⁶ Los tubos fueron girados, para su posterior sembrado.

Preparación de placas y sembrado

Para este procedimiento se utilizó 34 placas Petri que contenían agar Mueller Hinton, la cantidad de agar que utilizamos fue 30.6 gr, el cual fue pesado en una balanza analítica sobre un papel filtro y el contenido fue llevado a un matraz que contenía 900 ml de agua destilada ,se diluyo y luego se llevó al horno por el rango de 1 minuto, una vez disuelto se tapó la boquilla del matraz con algodón y

papel Graf, para ser llevado a la autoclave por 1 hora, luego de enfriar y ser manejable se colocó el contenido en cada una de las placas Petri (44 unidades).

En un ambiente estéril se procedió al sembrado de las placas con el ansa que contenía la *Streptococcus mutans*, utilizamos la técnica de disseminación.

Prueba de susceptibilidad

Para realizar la prueba de susceptibilidad procedimos a diluir extracto de *Punica granatum* (100%) en concentraciones de 75%, 50% y 25% respectivamente, para diluir utilizamos alcohol al 96%. Utilizamos el método (Kirby-Bauer) en este procedimiento, este método es recomendado en la actualidad por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos, se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente.⁴⁶

Preparamos 4 discos de papel filtro (esterilizados) por placa, para cada concentración se utilizaron 10 placas, la cantidad de extracto que utilizamos en cada disco fue 10 microlitros, que fue colocado con la ayuda de una pipeta (calibrada) que contenía respectivamente el extracto, con una pinza estéril fueron colocados sobre los cultivos previamente preparados, el mismo procedimiento se utilizó para el grupo control (clorhexidina al 0,12%), para el cual se utilizó 4 placas, continuación, se realizó el rotulado de las placas Petri con las siguientes iniciales 25% 50% 75% , 100% y grupo control, para identificar a los discos, una vez rotulado las placas fueron colocadas en un envase cerrado y tenía que estar en un ambiente de anaerobiosis de 37°C, para esto utilizamos la jarra Gass-Pack (consiste en colocar una vela dentro del envase y sellarlo para

obtener un ambiente de 5% de CO₂, luego se llevó a la incubadora y la primera lectura se realizó a las 24 horas luego a las 48 y 74 horas, los halos de inhibición alrededor de los discos se midieron con ayuda de una regla vernier.⁴⁶

El manejo de desechos se realizará de acuerdo al protocolo del Laboratorio de la Universidad Alas Peruanas.

4.4. Técnicas estadísticas para el procesamiento de la información

Procederemos a conseguir la estadística descriptiva de las variables del presente estudio (retención bacteriana, crecimiento bacteriano), los cuales se registrarán en una tabla de datos y se empleara análisis univariado.

Para el análisis bivariado se determinará la normalidad de la muestra mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Utilizamos las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y la prueba de Friedman, para comparar de la retención y crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

La información recolectada se procesará mediante el paquete estadístico SPSS versión 23 en español de Windows. Utilizando además una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2010 para la representación gráfica correspondiente.

4.5. Aspectos éticos

La presente investigación cumple los lineamientos establecidos por el colegio de Ética y Deontología del colegio Odontológico del Perú, se realizó en el Laboratorio Central UAP, y al ser un estudio experimental in vitro, no se necesitará la presencia de individuos, únicamente se utilizarán cepas microbianas. Asimismo, se utilizarán materiales e instrumental de laboratorio cuyo objetivo será evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico

de *Punica granatum* (granada) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175); por lo tanto, no se requiere de consentimiento informado ya que no involucra a seres humanos.

Se cumplen y aceptan los lineamientos establecidos por el comité de ética de la facultad de medicina humana y ciencias de la salud y se tendrá en cuenta la manipulación y el manejo de desecho de las muestras sobre la cepa de *Streptococcus mutans* de acuerdo con el manual de bioseguridad en el laboratorio de microbiología durante la ejecución del trabajo.

La ejecución de este trabajo siguió los principios de la declaración de Helsinki de la asociación médica mundial, adoptada por la 64° Asamblea General, (Fortaleza – Brasil 2013).

CAPITULO V. ANALISIS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis descriptivo

Este estudio experimental (in vitro) se llevó a cabo en el laboratorio central de la universidad alas peruanas, uno de los propósitos fue evaluar el efecto antibacteriano de la *Punica granatum* (granada) en sus disoluciones de 25 %, 50%, 75% y 100 % sobre el *Streptococcus* ATCC 27175, también se utilizó un grupo control que fue la clorhexidina ala 0,12%.

Tabla 2

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 25% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

25%	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Me
H24	10,00	16,57	0,24	16,13	16,88	16,63
H48	10,00	12,99	0,18	12,75	13,13	13,13
H72	10,00	12,99	0,16	12,75	13,25	12,94

Fuente: Base de datos

Al evaluar los halos de inhibición se evidencia que el extracto etanólico de *Punica granatum* al 25%, presenta una media de $16,57 \pm 0,24$ a las 24 horas, a diferencia de las 48 y 72 horas, con halos de inhibición de $12,99 \pm 0,18$ y $12,99 \pm 0,16$ respectivamente.

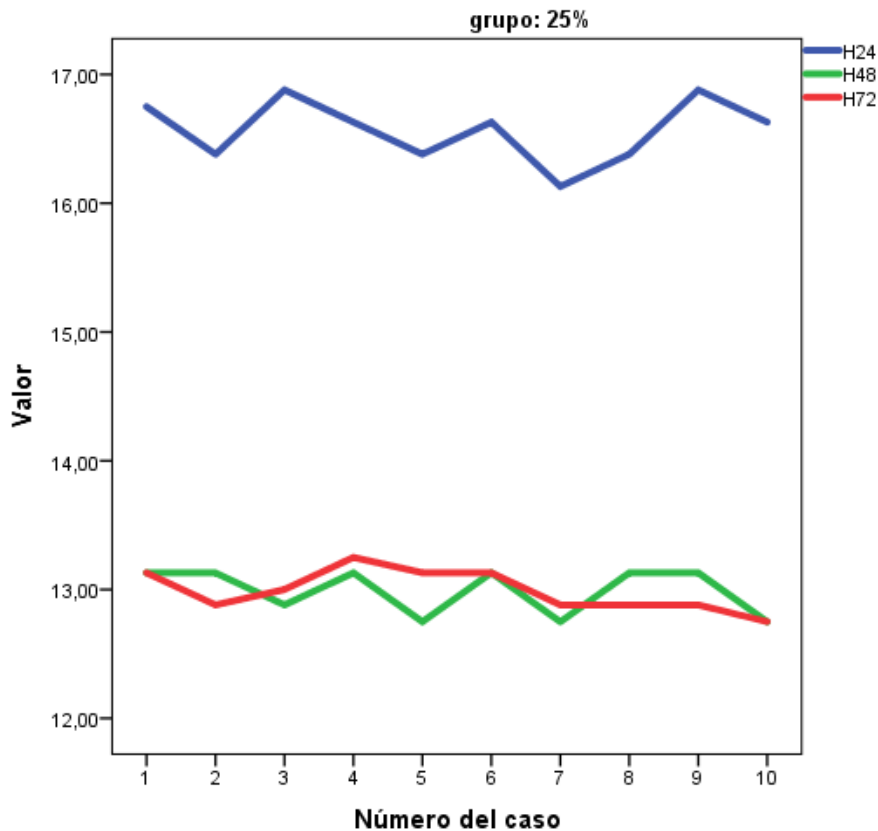


Grafico 1. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Tabla 3

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

50%	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Me
H24	10,00	20,80	0,33	20,38	21,38	20,75
H48	10,00	15,64	0,28	15,13	16,00	15,75
H72	10,00	15,78	0,08	15,63	15,88	15,75

Fuente: Base de datos

Al evaluar los halos de inhibición se evidencia que el extracto etanólico de *Punica granatum* al 50%, presenta una media de $20.80 \pm 0,33$ a las 24 horas, a diferencia de las 48 y 72 horas, con halos de inhibición de $15,64 \pm 0,28$ y $15,78 \pm 0,08$ respectivamente.

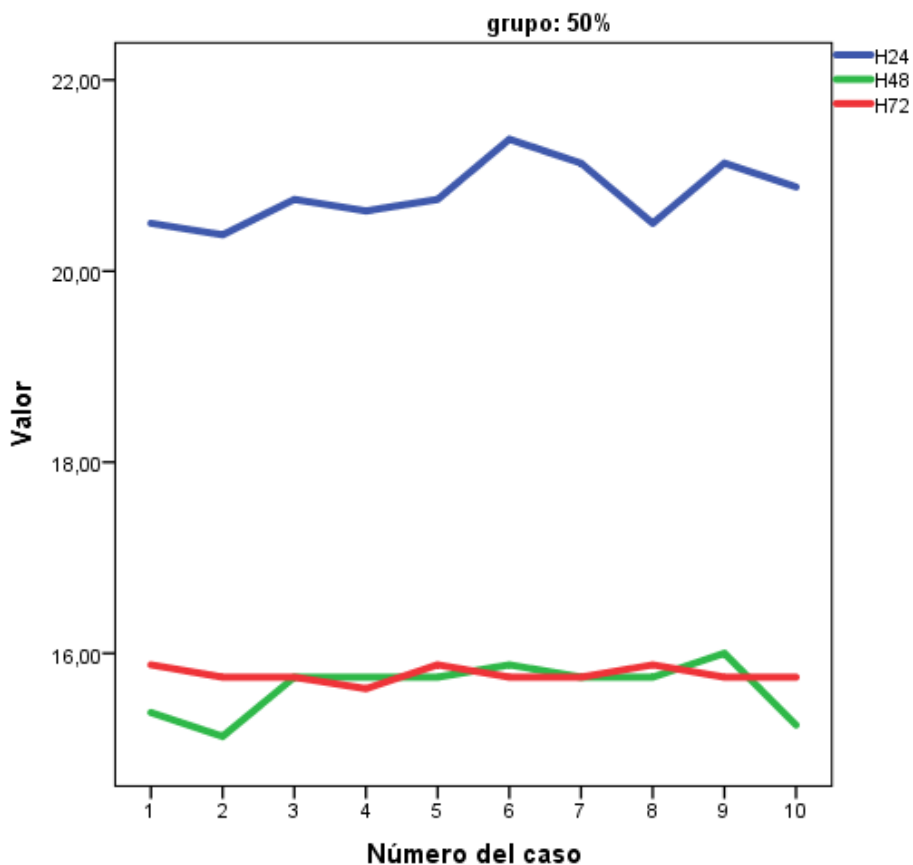


Gráfico 2. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 50% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Tabla 4

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 75% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

75%	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Me
H24	10,00	22,15	0,23	21,75	22,50	22,13
H48	10,00	17,44	0,30	17,13	17,88	17,38
H72	10,00	17,18	0,09	17,00	17,25	17,19

Fuente: Base de datos

Al evaluar los halos de inhibición se evidencia que el extracto etanólico de *Punica granatum* al 75%, presenta una media de $22,15 \pm 0,23$ a las 24 horas, a diferencia de las 48 y 72 horas, con halos de inhibición de $17,44 \pm 0,30$ y $17,18 \pm 0,09$ respectivamente.

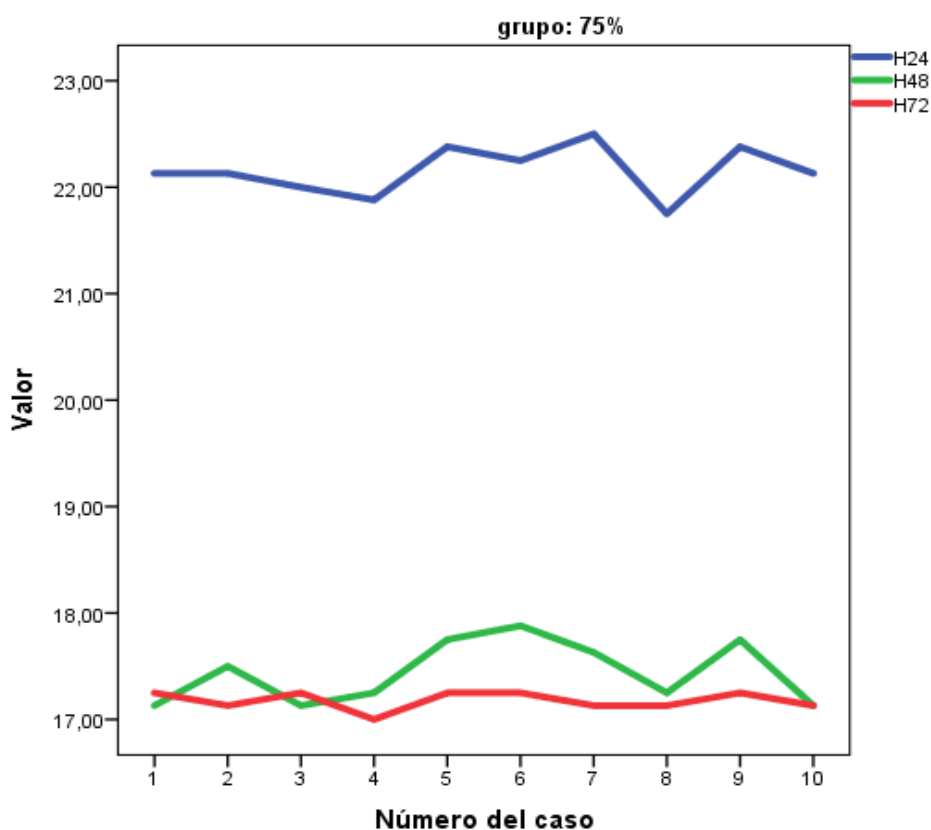


Gráfico 3. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 75% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Tabla 5

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

100%	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Me
H24	10,00	26,79	0,10	26,63	26,88	26,82
H48	10,00	21,82	0,25	21,50	22,25	21,76
H72	10,00	21,34	0,18	21,13	21,63	21,38

Fuente: Base de datos

Al evaluar los halos de inhibición se evidencia que el extracto etanólico de Punica granatum al 100%, presenta una media de $26,79 \pm 0,10$ a las 24 horas, a diferencia de las 48 y 72 horas, con halos de inhibición de $21,82 \pm 0,25$ y $21,34 \pm 0,18$ respectivamente.

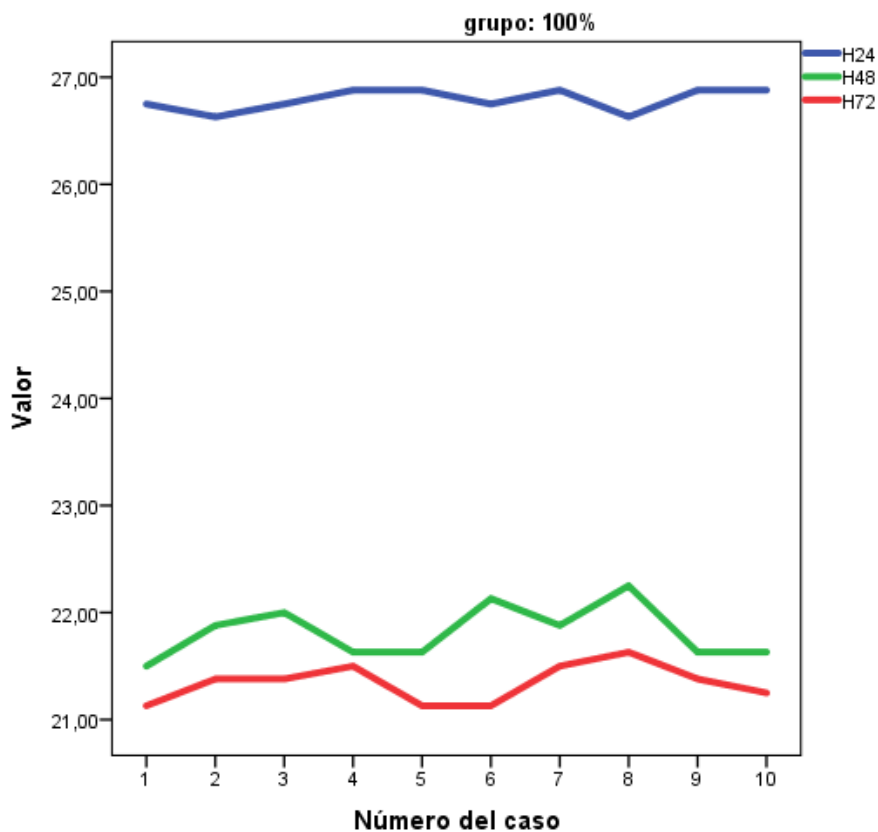


Grafico 4. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Tabla 6

Efecto antibacteriano in vitro (halo de inhibición) del control positivo sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Control +	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo	Me
H24	4,00	31,69	0,16	31,50	31,88	31,69
H48	4,00	31,69	0,16	31,50	31,88	31,69
H72	4,00	31,69	0,16	31,50	31,88	31,69

Fuente: Base de datos

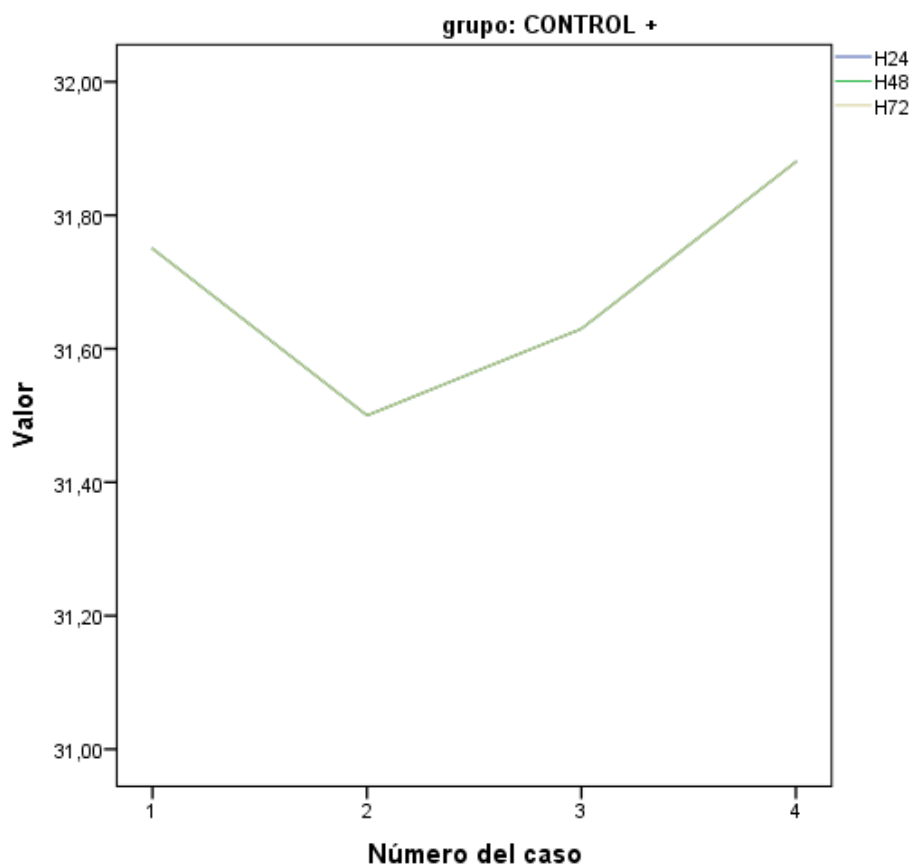


Grafico 5. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del control positivo sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

5.2. Análisis inferencial

Tabla 7

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

H24	N	Media	Desviación n estándar	Mínimo	Máximo	Me	p*
25%	10,00	16,57	0,24	16,13	16,88	16,63	0,000
50%	10,00	20,80	0,33	20,38	21,38	20,75	
75%	10,00	22,15	0,23	21,75	22,50	22,13	
100%	10,00	26,79	0,10	26,63	26,88	26,82	
Control +	4,00	31,69	0,16	31,50	31,88	31,69	

*Prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,05$)

Para evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* a las 24 horas, se realizó la medición de los halos de inhibición, donde se evidencia la mayor medición en la concentración al 100% ($26,79 \pm 0,10$), cercana al control positivo, con una media de $31,69 \pm 0,16$. EL menor promedio de halo de inhibición se presentó en la concentración al 25% ($16,57 \pm 0,24$). Para establecer si existe diferencias en el efecto entre las diferentes concentraciones, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, donde se obtuvo un valor $p = 2,573E-08$ determinándose que al menos uno de los grupos es diferente.

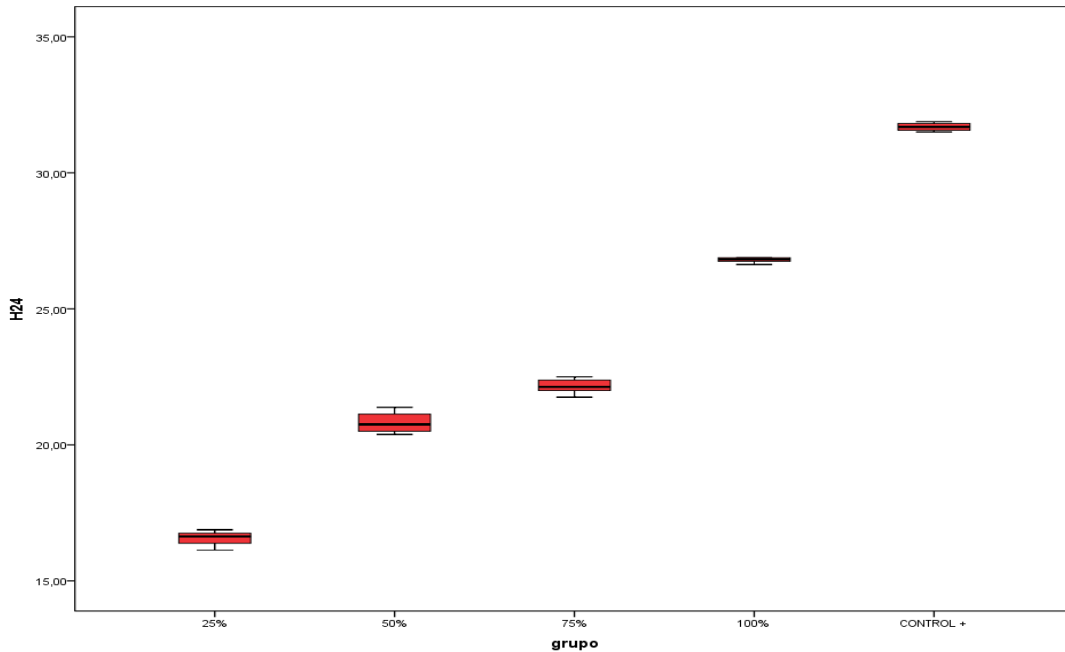


Gráfico 6. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Tabla 8

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

H48	N	Media	Desviación n estándar	Mínimo	Máximo	Me	p*
25%	10,00	12,99	0,18	12,75	13,13	13,13	0,000
50%	10,00	15,64	0,28	15,13	16,00	15,75	
75%	10,00	17,44	0,30	17,13	17,88	17,38	
100%	10,00	21,82	0,25	21,50	22,25	21,76	
Control +	4,00	31,69	0,16	31,50	31,88	31,69	

*Prueba de Kruskal Wallis (p<0,05)

Para evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* a las 48 horas, se realizó la medición de los halos de inhibición, donde se evidencia la mayor medición en la concentración al 100% (21,79±0,25),

cercana al control positivo, con una media de $31,69 \pm 0,16$. EL menor promedio de halo de inhibición se presentó en la concentración al 25% ($12,99 \pm 0,18$). Para establecer si existe diferencias en el efecto entre las diferentes concentraciones, se aplicó la prueba de Kruskal Wallis, donde se obtuvo un valor $p=2,454E-08$ determinándose que al menos uno de los grupos es diferente.

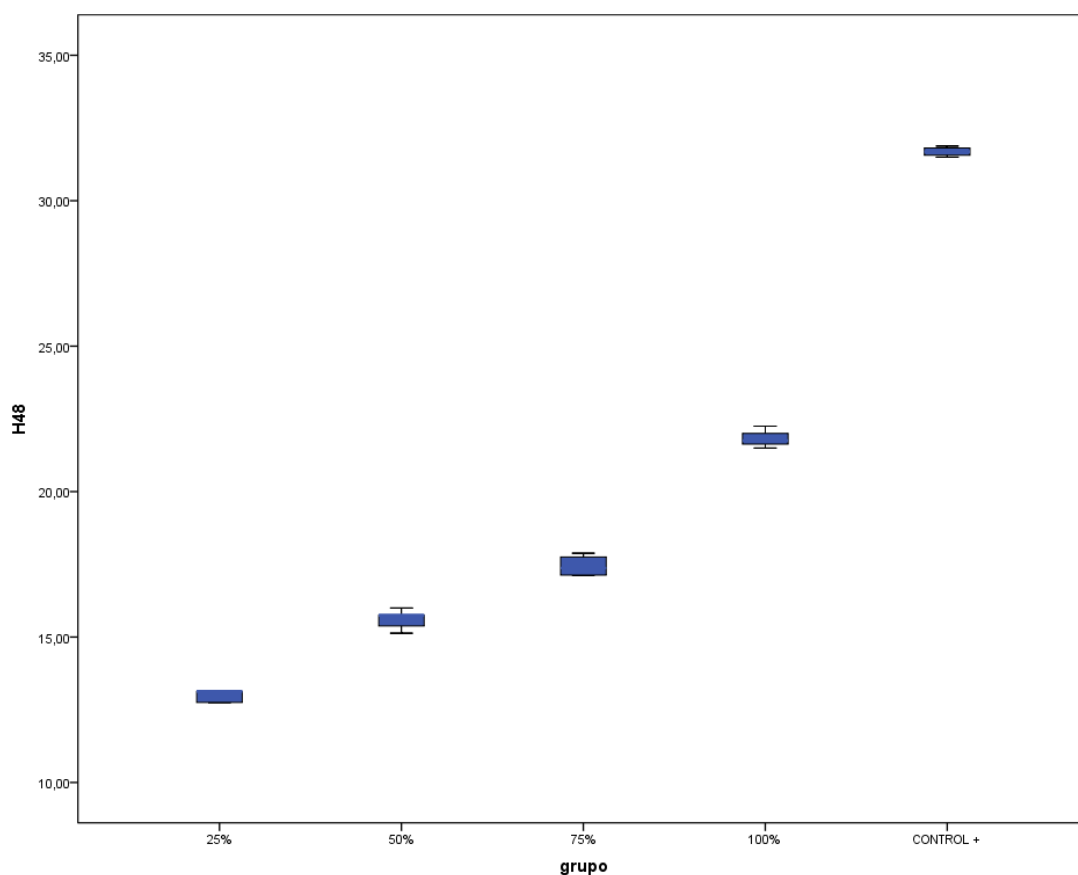


Grafico 7. Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Tabla 9

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

H72	N	Media	Desviació		Mínimo	Máximo	Me	p*
			n	estándar				
25%	10,00	12,99	0,16		12,75	13,25	12,94	0,000
50%	10,00	15,78	0,08		15,63	15,88	15,75	
75%	10,00	17,18	0,09		17,00	17,25	17,19	
100%	10,00	21,34	0,18		21,13	21,63	21,38	
Control +	4,00	31,69	0,16		31,50	31,88	31,69	

*Prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,05$)

2,40056467907773E-08

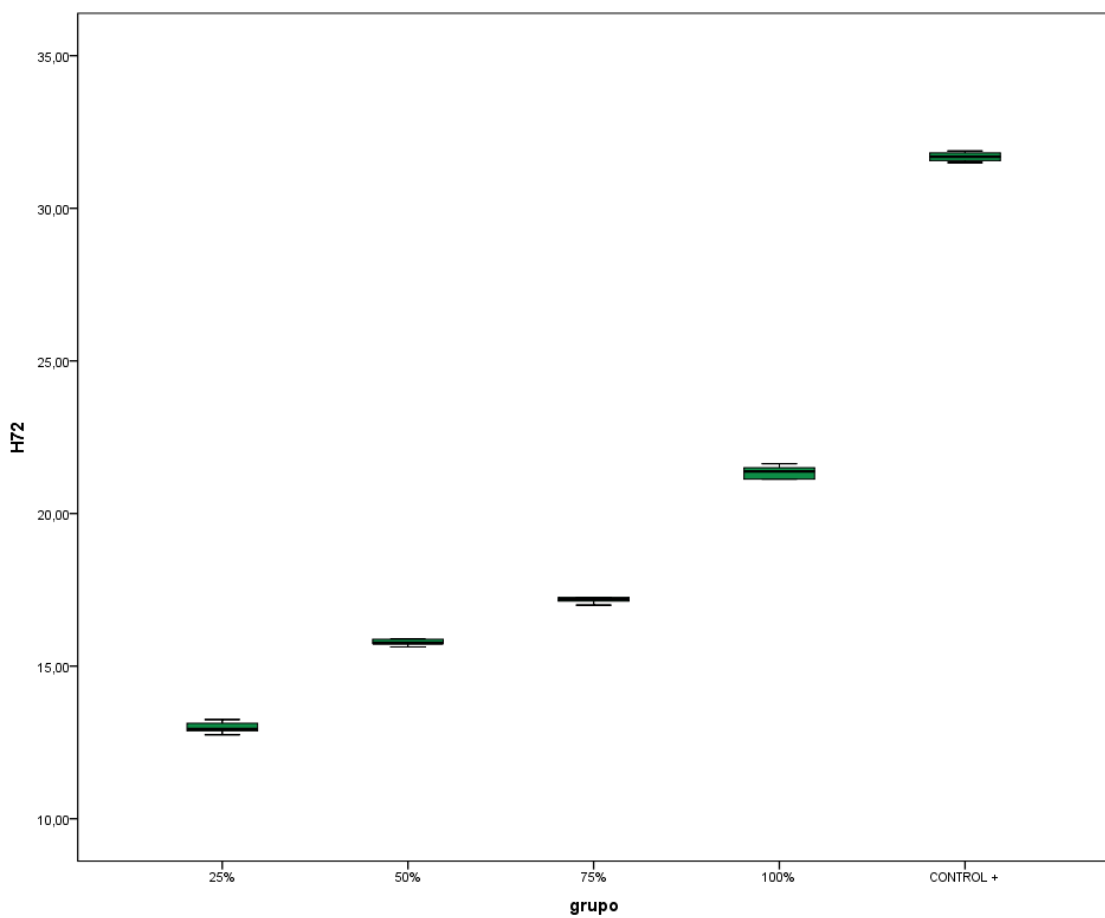


Grafico 8. Efecto antibacteriano in vitro (halo de inhibición) del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Tabla 10

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 25% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

25%	N	Media	Desviación n estándar	Mínimo	Máximo	Me	p*
H24	10	16,57	0,24	16,13	16,88	16,63	0,000
H48	10	12,99	0,18	12,75	13,13	13,13	
H72	10	12,99	0,16	12,75	13,25	12,94	

*Prueba de Friedman, $p < 0,00$

Para determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* al 25%, se realizó la medición de los halos de inhibición, en 3 momentos, 24, 48 y 72 horas, donde se evidencia la mayor medición en la concentración a las 24 horas ($16,57 \pm 0,24$), Para establecer si existe diferencias en el efecto entre los diferentes momentos, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman, donde se obtuvo un valor $p = 0,00029$ determinándose que al menos uno de los momentos de medición es diferente.

Tabla 11

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 50% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

50%	N	Media	Desviación n estándar	Mínimo	Máximo	Me	p*
H24	10	20,8	0,33	20,38	21,38	20,75	0,000
H48	10	15,64	0,28	15,13	16	15,75	
H72	10	15,78	0,08	15,63	15,88	15,75	

*Prueba de Friedman, $p < 0,00$

0,000335462627902512

Para determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* al 50%, se realizó la medición de los halos de inhibición, en 3 momentos, 24, 48 y 72 horas, donde se evidencia la mayor medición en la concentración a las 24 horas (20,8±0,33), Para establecer si existe diferencias en el efecto entre los diferentes momentos, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman, donde se obtuvo un valor $p=0,00033$ determinándose que al menos uno de los momentos de medición es diferente

Tabla 12

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 75% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

75%	N	Media	Desviación n estándar	Mínimo	Máximo	Me	p*
H24	10	22,15	0,23	21,75	22,5	22,13	0,000
H48	10	17,44	0,3	17,13	17,88	17,38	
H72	10	17,18	0,09	17	17,25	17,19	

*Prueba de Friedman, $p<0,00$

0,000240369476419514

Para determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* al 75%, se realizó la medición de los halos de inhibición, en 3 momentos, 24, 48 y 72 horas, donde se evidencia la mayor medición en la concentración a las 24 horas (22,15±0,24), Para establecer si existe diferencias en el efecto entre los diferentes momentos, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman, donde se obtuvo un valor $p=0,00024$ determinándose que al menos uno de los momentos de medición es diferente

Tabla 13

Efecto antibacteriano in vitro (halos de inhibición) del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 100% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

100%	N	Media	Desviación n estándar	Mínimo	Máximo	Me	p*
H24	10	26,79	0,1	26,63	26,88	26,82	0,000
H48	10	21,82	0,25	21,5	22,25	21,76	
H72	10	21,34	0,18	21,13	21,63	21,38	

*Prueba de Friedman, $p < 0,00$

0,0000453999297624849

Para determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Punica granatum* al 100%, se realizó la medición de los halos de inhibición, en 3 momentos, 24, 48 y 72 horas, donde se evidencia la mayor medición en la concentración a las 24 horas ($26,57 \pm 0,1$), Para establecer si existe diferencias en el efecto entre los diferentes momentos, se aplicó la prueba no paramétrica de Friedman, donde se obtuvo un valor $p = 0,00045$ determinándose que al menos uno de los momentos de medición es diferente

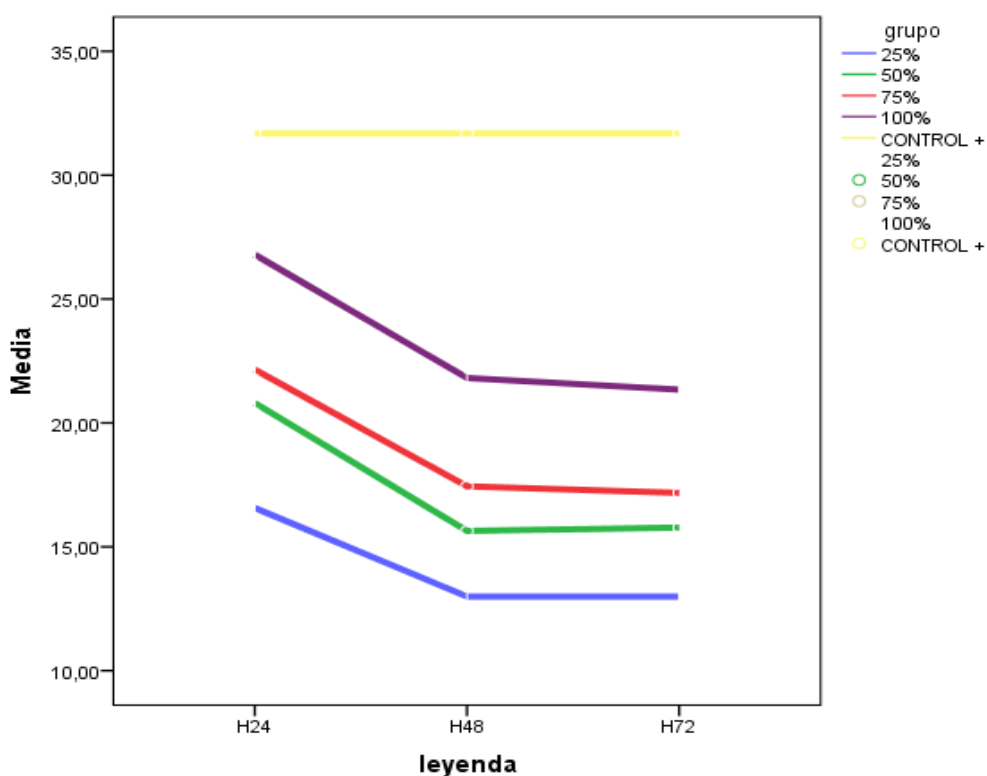


Grafico 9. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

5.3. Comprobación de hipótesis, técnicas estadísticas

Tabla 14

Prueba de Normalidad para determinar la distribución de los datos cuantitativos

Pruebas de normalidad				
Grupo		Shapiro-Wilk		
		Estadístico	Gl	Sig.
H24	25%	,925	10	,397
	50%	,943	10	,582
	75%	,965	10	,840
	100%	,782	10	,009
	CONTROL +	,995	4	,983
H48	25%	,685	10	,001
	50%	,849	10	,056
	75%	,863	10	,084
	100%	,901	10	,223
	CONTROL +	,995	4	,983
H72	25%	,903	10	,236
	50%	,793	10	,012
	75%	,779	10	,008
	100%	,905	10	,249
	CONTROL +	,995	4	,983

Se plantean las siguientes hipótesis estadísticas:

Ho: Los datos siguen una distribución normal

Ha: Los datos no siguen una distribución normal

Regla: si $p < 0,05$ Rechazo Ho

Se determinó la distribución de los datos, a través de la prueba de normalidad de Shapiro Wilks, donde los grupos de la concentración al 100% a las 24 horas, 25% a las 48 horas, 50% y 75% a las 72 horas, mostraron no seguir una distribución normal, por lo que se utilizarán pruebas no paramétricas.

Tabla 15

Prueba de Kruskal Wallis, para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	H24
Chi-cuadrado	41,091
Gl	4
Sig. Asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: grupo

Se plantean las siguientes hipótesis estadísticas:

Ho: No existe diferencias entre las concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum a las 24 horas

Ha: Existe diferencias en al menos una de las concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum a las 24 horas

Se realizó la prueba de Kruskal Wallis, donde se obtuvo un valor $p=0,000$, rechazando la H_0 , y concluyendo que existe diferencias en al menos una de las concentraciones.

Tabla 16

Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) a las 24 horas sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
25%-50%	-10,000	5,736	-1,743	,081	,813
25%-75%	-20,000	5,736	-3,487	,000	,005
25%-100%	-30,000	5,736	-5,230	,000	,000
25%-CONTROL +	-37,000	7,588	-4,876	,000	,000
50%-75%	-10,000	5,736	-1,743	,081	,813
50%-100%	-20,000	5,736	-3,487	,000	,005
50%-CONTROL +	-27,000	7,588	-3,558	,000	,004
75%-100%	-10,000	5,736	-1,743	,081	,813
75%-CONTROL +	-17,000	7,588	-2,240	,025	,251
100%-CONTROL +	-7,000	7,588	-,922	,356	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.

Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.

Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias

Para determinar las diferencias entre las concentraciones, se realizaron comparaciones múltiples por pares a través de la Prueba de Dunn Benferroni, donde se evidencia que el extracto al 25% presenta diferencias estadísticamente

significativas con las otras concentraciones y los grupos del 75%, 100% y control positivo son similares a las 24 horas.

Tabla 17

Prueba de Kruskal Wallis, para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	H48
Chi-cuadrado	41,190
Gl	4
Sig. Asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: grupo

Tabla 18

Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de Punica granatum (granada) a las 48 horas sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
25%-50%	-10,000	5,729	-1,745	,081	,809
25%-75%	-20,000	5,729	-3,491	,000	,005
25%-100%	-30,000	5,729	-5,236	,000	,000
25%-CONTROL +	-37,000	7,579	-4,882	,000	,000
50%-75%	-10,000	5,729	-1,745	,081	,809
50%-100%	-20,000	5,729	-3,491	,000	,005
50%-CONTROL +	-27,000	7,579	-3,562	,000	,004
75%-100%	-10,000	5,729	-1,745	,081	,809
75%-CONTROL +	-17,000	7,579	-2,243	,025	,249
100%-CONTROL +	-7,000	7,579	-,924	,356	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.

Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.

Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias

Tabla 19

Prueba de Kruskal Wallis, para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Estadísticos de prueba ^{a,b}	
	H72
Chi-cuadrado	41,237
Gl	4
Sig. Asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: grupo

Tabla 20

Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) a las 72 horas sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
25%-50%	-10,000	5,726	-1,746	,081	,807
25%-75%	-20,000	5,726	-3,493	,000	,005
25%-100%	-30,000	5,726	-5,239	,000	,000
25%-CONTROL +	-37,000	7,575	-4,885	,000	,000
50%-75%	-10,000	5,726	-1,746	,081	,807
50%-100%	-20,000	5,726	-3,493	,000	,005
50%-CONTROL +	-27,000	7,575	-3,565	,000	,004
75%-100%	-10,000	5,726	-1,746	,081	,807
75%-CONTROL +	-17,000	7,575	-2,244	,025	,248
100%-CONTROL +	-7,000	7,575	-,924	,355	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.

Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.

Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias

Tabla 21

Prueba de Friedman, para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Estadísticos de prueba ^a		
25%	N	10
	Chi-cuadrado	16,27
		0
	GI	2
	Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Friedman

Se plantearon las siguientes hipótesis estadísticas:

Ho: No existen diferencias entre los momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum al 25%

Ha: Existe diferencias en al menos uno de los momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum l 25%

Para determinar si existen diferencias entre los momentos de evaluación, se realizó la Prueba de Friedman, donde se determinó que existe diferencias en al menos un momento, con un valor $p=0,000$.

Tabla 22

Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
H48-H72	-,100	,447	-,224	,823	1,000
H48-H24	1,550	,447	3,466	,001	,002
H72-H24	1,450	,447	3,242	,001	,004

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.
 Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.
 Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias

Se realizaron comparaciones múltiples, concluyéndose que la medición de los halos de inhibición del extracto etanólico de *Punica granatum* al 25% a las 24 horas, difieren de las 48 y 72 horas, siendo estas similares.

Tabla 22

Prueba de Friedman, para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de *Punica granatum* (granada) al 50% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Estadísticos de prueba ^a		
50%	N	10
	Chi-cuadrado	16,000
	Gl	2
	Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Friedman

Tabla 23

Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de *Punica granatum* (granda) al 50% sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
H48-H72	-,200	,447	-,447	,655	1,000
H48-H24	1,600	,447	3,578	,000	,001
H72-H24	1,400	,447	3,130	,002	,005

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.

Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.

Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias

Tabla 24

Prueba de Friedman, para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Estadísticos de prueba ^a		
75%	N	10
	Chi-cuadrado	16,667
	GI	2
	Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Friedman

Tabla 25

Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 75% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
H72-H48	,500	,447	1,118	,264	,791
H72-H24	1,750	,447	3,913	,000	,000
H48-H24	1,250	,447	2,795	,005	,016

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.
 Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.
 Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias

Tabla 26

Prueba de Friedman, para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Estadísticos de prueba ^a		
100%	N	10
	Chi-cuadrado	20,000
	Gl	2
	Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Friedman

Tabla 27

Comparaciones múltiples para determinar diferencias entre los diferentes momentos de evaluación del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre el crecimiento de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
H72-H48	1,000	,447	2,236	,025	,076
H72-H24	2,000	,447	4,472	,000	,000
H48-H24	1,000	,447	2,236	,025	,076

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.
 Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.
 Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias

5.4. Discusión

En esta investigación buscamos determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Punica granatum* en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100 % sobre una cepa de *Streptococcus mutas* (ATCC 25175).

El uso de la medicina herbaria data de muchos años y ha sido empleada para curar enfermedades de diferente índole, por este motivo se han realizado estudios científicos de algunas plantas que han demostrado tener gran efectividad en la salud , como la granada, usada en la medicina tradicional y que estudios han demostrados que tienen propiedades (antioxidantes y antiinflamatorias), también se ha demostrado su actividad anticancerígena; además en el estudio realizado por HEMANI K, GHEENAS S (2018) buscando determinar la mayor actividad antimicrobiana entre extracto de semilla y cascara de granada sobre en 8 microorganismos, se concluyó que el extracto de la cascara de granada tiene mayor actividad antimicrobiano; la gran cantidad de flavonoides y taninos encontrados en la cascara tiene una alta actividad antioxidante y también es utilizada como tratamiento en la disentería, diarrea,

acidosis hemorragias, además tiene un buen efecto antibacteriano y antifúngico, tiene propiedades fotoquímicas que se encuentran presentes en diferentes partes de la planta y los principales fitoquímicos son los polifenoles (anillos fenólicos con múltiples hidroxilos grupales) los polifenoles incluyen: flavonoides, taninos condensados, taninos hidrosolubles estos se encuentran en las cascarras membranas y medulas , los taninos hidrosolubles son polifenoles predominantes que se encuentran en el jugo de granada y representan un 92% se su actividad antioxidante, la granada contiene vitamina K que ayuda a la coagulación, enfermedad cardiaca y también previene trastornos digestivos, contiene fibra que ayuda a reducir el colesterol reduciendo el riesgo de enfermedad coronaria, Contiene vitamina C que beneficia la circulación.^{12,13,15}

Las propiedades antibacterianas y antimicrobianas de *Punica granatum* han sido ampliamente estudiado y demostrado por varios científicos de todo el mundo. Por lo tanto, el efecto antibacteriano y los atributos antimicrobianos de *Punica granatum* pueden ser aplicado en el campo de la odontología, para que a partir de ello podamos tener medios profilácticos.¹⁶

El *Streptococcus mutans* es el principal agente de la caries dental, por este motivo este estudio in vitro, tiene como finalidad, evaluar efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La clorhexidina al 0,12% ha sido considera un grupo de control en este estudio, Según ESCAMILLA G, et al (2017) esta posee un estándar e oro, es un antiséptico y desinfectante de amplio espectro, pero puede producir efectos secundarios, como decoloración del esmalte, pigmentación de restauraciones, mal sabor e irritación en la mucosa

oral, con esto queremos utilizar un producto natural a base de granada, ya que no produce efectos secundarios.

Los resultados de nuestro estudio guardan relación con lo expuesto por FARNAZ H, et al.¹⁶ (2016) que concluyeron que el extracto hidroalcohólico de cascara de *Punica granatum* tiene efecto antibacteriano sobre la cepa *Streptococcus mutans*, con una media de 17.5 ± 0.41 , lo que es similar a nuestros resultados, ya que en nuestro estudio se descubrió que el extracto de *Punica granatum* tiene efecto antibacteriano sobre la cepa de *Streptococcus mutans*; según la escala de duraffourd la cepa de *Streptococcus mutans* es sumamente sensible (+++), con una media de 26.79 ± 0.10 . En lo que difiere de nuestros resultados, es que el efecto máximo sobre *Streptococcus mutans* en la investigación de Farnaz, fue en las concentración de 3.9 ml mientras que nuestro efecto máximo fue en la concentración de 5 ml al 100%, también la diferencia puede deberse a la procedencia, cultivo y clima de la granada.¹⁶

Los resultados del presente estudio fueron consistentes con los realizados por ZANDISWA G, et al¹⁷ (2016) y GRAZIELLE M¹⁹, (2017) que también llegaron a la conclusión que existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Punica granatum* sobre *S. mutans*. En la investigación realizada por HEMANI K, GHEENAS S (2018), buscaban evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Punica granatum* de semillas y cascara sobre patógenos orales entre ellos el *Streptococcus mutans*, obteniendo como resultado que la mayor actividad antimicrobiana se observó en el extracto de cascara de *Punica granatum* con una media de 18.5 ± 0.4 . en nuestro estudio comprobamos que la cascara de

granada tiene efecto antibacteriano y al igual que este estudio promete ser efectiva contra la caries.

El mayor efecto antibacteriano en este estudio, fue a las 24 horas, luego el efecto descendió a las 48 y 72 horas, pero se mantuvo, esto determinó su semejanza al estudio realizado por BERNAL R, et al¹⁹ (2017), cuyo principal objetivo era saber si el extracto hidroalcohólico de la cascara de *Punica granatum* afectaba en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), bacterias Gram positivas, concluyeron que, a mayor concentración de extracto, el halo de inhibición era mayor, y esto era a las primeras 24 horas, luego el efecto disminuía en poca proporción, lo mismo que nuestro estudio.

RAMOS A²² (2017), realizo un estudio, para saber si el extracto de *p. granatum* tenía un efecto sobre cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, se midieron los halos de inhibición a las 24, 48 y 72 horas, concluyeron que a las 24 horas se visualizaron mejores resultados, con halos de inhibición de 21.30 mm en la concentración de 90 %, mientras que en nuestro estudio obtuvimos halos de imbibición 26,79 mm al 100% siendo mayor que el estudio realizado por RAMOS A, en lo que coincidimos fue que en ambos resultados el mayor efecto antibacteriano fue a las horas 24 horas, tan igual al estudio de BERNAL R. et al (2017).

SANKET K, et al²¹ (2018) El objetivo de este estudio es evaluar la eficacia antimicrobiana del extracto de cáscara de granada en concentraciones de 75 % y 100% como grupo control se utilizó a la clorhexidina al 0,12% en los resultados que obtuvieron las concentraciones de extracto de cáscara de granada al 100%,

y el extracto de cáscara de granada al 75% mostraron una reducción significativa en el recuento de colonias de *Streptococcus mutans* con una media de 17.47 y 15.39 respectivamente, al igual que nuestro estudio se obtuvo una reducción de las colonias, pero las medias de los mismos porcentajes fueron superiores, la prueba de Dunn Benferroni, determino las concentraciones de extracto de *Punica granatum* al 75% ,100% y el control positivo (clorhexidina 0,12%) son iguales y el mayor efecto antibacteriano fue a las 24 horas. Ellos llegaron a la conclusión que el extracto de cáscara de granada se puede usar en lugar de la como la clorhexidina, para evitar efectos secundarios, la media fue 15.92. Sin embargo, en nuestro estudio la clorhexidina al 0,12% tuvo una media de 31.69 se requerirá más investigación clínica.

El presente estudio puede servir como precedente para futuras investigaciones, ya que presenta efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*, no es toxico. La granada y sus compuestos derivados en este caso la cascara demostraron su efectividad, no posee efectos secundarios ya que tiene origen natural, aunque existe evidencia respecto a las propiedades antibacterianas entre otras, se necesitan realizar investigaciones in vivo.

CONCLUSIÓN

- El efecto antibacteriano del extracto etanólico de cascara de Punica granatum sobre el Streptococcus mutans se presentó en todas las concentraciones.
- El menor efecto antibacteriano fue en la concentración de 25 % a las 72 horas respectivamente y su mayor efecto fue a las 24 horas.
- Al evaluar el efecto antibacteriano de Punica granatum al 50% se evidencio tener un efecto antibacteriano, siendo mayor a las 24 horas y el menor a las 72 horas.
- El mayor efecto antibacteriano fue al 100 % a las 24 horas, concluyendo que el mayor efecto antibacteriano se obtuvo a las 24 horas.
- En la prueba de Dunn Benferroni se evidenció que el extracto de Punica granatum al 25% presenta diferencias con las otras concentraciones y las concentraciones de 75 % 100% y el control positivo clorhexidina al 0,12% son iguales estadísticamente a las 24 horas, demostrando tener un efecto antibacteriano bueno.
- El extracto de cáscara de Punica granatum, pueden ser utilizado como un medio profiláctico en lugar de productos comercialmente disponible, como la clorhexidina, para evitar sus efectos secundarios. Sin embargo, se requerirá más investigación en otros microorganismos orales y también clínicamente.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar investigaciones aplicando la *Punica granatum* (in vivo) experimentando con animales, para posteriormente ser utilizado en humados y medir su eficacia, a través de profilácticos como enjuagues bucales y dentífricos.
- Se recomienda seguir con estudios de otras plantas o frutos, para obtener medios naturales con los cuales se puedan prevenir enfermedades en la cavidad oral.
- Se recomienda realizar investigaciones aplicando el extracto etanólico de *Punica granatum* en otros microorganismos orales y así determinar su efectividad.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Larepublica.pe. [internet]. Perú: diario la república.2018 [actualizado 19 abr 2018; citado 15 sep. 2018]. disponible en:
larepublica.pe/sociedad/1229737-la-salud-dental-de-los-peruanos-estan-en-riesgo-segun-el-colegio-odontologico.
2. Marcenes w, Kassebaum NJ, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJ. Oral diseases affect some 3.9 billion people. Dental public health [artículo de internet]. 2018 [acceso 10 de diciembre 2019]; 14(1):35. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/6400925.pdf?origin=ppub>
3. Cabrera C, Arancet M, Martinez D, Cueto A, Espinoza S. Salud Oral en Población Escolar Urbana y Rural. Int. J. Odontostomat [artículo de Internet]. 2018[acceso 10 de diciembre 2018]; 9(3): 341. Disponible en:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijodontos/v9n3/art01.pdf>
4. Martins S, Álvarez E, Abanto J, Cabrera A, López R, Masoli C, et al. Epidemiología de la caries dental en América latina. ALOP [artículo de internet]. 2019 [acceso 15 de febrero 2019]; 4(2). disponible en URL:
<http://www.revistaodontopeditria.org/ediciones/2014/2/art-4/>
5. Vargas R, Herrera M. Estudio de la prevalencia de caries en escolares de las comunidades rurales Mapuches de Panguilín, Puñique, y Lago Neltume. Provincia de Valdivia. Revista Dental de Chile [artículo de internet]. 2018[acceso 14 de diciembre 2018]; 14; 93(3): 3-8. Disponible en:
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v3n2/art02.pdf>

6. Ojeda Oviedo E, Salas L. Streptococcus mutans and dental caries. Revista CES Odontología [artículo de internet]. 2019 [acceso 22 de enero 2019]; 26(1):1-13. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
7. White LB, Foster S, Staff H, For H. El Recetario Herbario: Las mejores alternativas naturales a los medicamentos. Emmaus, PA: Rodale Books; 2004; 672 pp.
8. OMS | Medicina tradicional: definiciones [artículo de Internet].2019. [acceso 18 de enero de 2019]. Disponible en:
http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
9. Lopez O, Palou. E et al. Granada (Punica granatum L): una fuente de antioxidantes de interés actual. Temas selectos de ingeniería de alimentos [revista de internet]. 2019[acceso 22 de febrero 2019]; 1(4): 64-73. Disponible en:
[https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4\(1\)-Lopez-Mejia-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-1/TSIA-4(1)-Lopez-Mejia-et-al-2010.pdf)
10. Marsh, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology-Sgm [artículo de internet]. 2019 [acceso 22 de febrero de 2019]; 149:279-294. Disponible en:
<https://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.26082-0>
11. Pascual Casamayor D, Pérez Campos YE, Morales Guerrero I, Castellanos Coloma I, González Heredia E. Algunas consideraciones sobre el surgimiento

- y la evolución de la medicina natural y tradicional. MEDISAN [revista de internet]. 2014[acceso 15 enero de 2019]; 18(10):1467–74. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102930192014001000019
12. Rainer W, Douglas Sharon. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú [libro de internet]. 1ª ed. Perú: editorial graphicart; 2015 [acceso 15 de enero 2019]. Disponible en: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/plantasmedicinales_espaol_secure.pdf
13. Grazielle M, Apa J, Ariya R, et al. Inhibitory Effects of Punica Granatum Gel on Cariogenic Bacteria: An in vitro Study. Int jou [artículo de internet]. 2017 [acceso 15 de enero 2019]; 10(2):152. Disponible en: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Antibacterial_Inhibitory_Effects_of_Punica_Granatu.pdf
14. Cárdenas C, Rodríguez I. Efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de Punica granatum L. “granada” sobre la viabilidad de Staphylococcus aureus “in vitro”. Repositorio inst [artículo internet]. 2019 [acceso 19 de marzo 2019]. disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/3168>
15. Uribe L, Jaime A. estudio de prefactibilidad para la instalación de una empresa productora de granada (Punica granatum L. var. wonderful) para su comercialización en el mercado internacional [INTERNET]. 2016. tesis. actualizado el 18 de oct 2018. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2726>.

16. Farnaz Hajifattahi, Elham Moravej-Salehi. Antibacterial Effect of Hydroalcoholic Extract of Punica granatum Linn. Petal on Common Oral Microorganisms. International Journal of Biomaterials. 2016; 6(5) 1-7.
17. Zandiswa G, Mrudula. Effect of Punica granatum on the virulence factors of cariogenic bacteria Streptococcus mutans. Microbial Pathogenesis [artículo internet], 2016 [acceso 17 de julio de 2019]; 98: 45-49. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.027>
18. S. Aravindraj, M. Preethi. Antimicrobial Effects of Punica granatum Extracts on Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Lactobacillus acidophilus, Enterococcus faecalis and Candida albicans. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci [artículo internet], 2017 [acceso 20 de octubre del 2019]; 6(9): 2762-2774. Disponible en: <http://www.ijcmas.com>
19. Grazielle M, Apa J, Ariya R. Antibacterial inhibitory effects of Punica granatum gel on cariogenic bacteria: an in vitro study. Int J Clin Pediatr Dent [artículo internet], 2017 [acceso 25 de julio del 2019]; 10(2): 152-15. Disponible en: ncbi.nlm.nih.gov/pmc/article
20. Hemani K, Gheena.S. Evaluation of antimicrobial property of extract of punica granatum (L.) on oral pathogens. Int. J. Life Sci. Pharma Res [artículo de internet], 2018 [acceso 26 de julio del 2019]; 8(3): 35-40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.22376/ijpbs/lpr.2018.8.3.P35-40>
21. Sanket k, Nikita K, Alok P, Preetan S, Rahul L. comparative evaluation of Antimicrobial properties of pomegranate peel extract against Streptococcus mutans and Lactobacillus - an in vitro study. International Dental & Medical

Journal of Advanced Research [artículo de internet], 2018 [acceso 15 de mayo del 2019]; 4(1): 1–6. Disponible en:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Comparative-Evaluation-of-Antimicrobial-Properties-Kunte-Kadam>

22. Bernal R, Rodríguez I. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Punica granatum* sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* “in vitro”. *Reviolest* [revista de internet]. 2019 [acceso 12 de marzo de 2019]; 2(1):22. Disponible en:

<http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/639/587>

23. Ramos A. Efecto antibacteriano in vitro del extracto de *Punica granatum* en *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Uandina* [revista de internet]. 2017 [acceso 27 de junio de 2019]; 2(1):22. Disponible en:

<http://repositorio.uandina.edu.pe/handle/UAC/1747>

24. Escobar F, Bernardita J. Actividad antibacteriana de los extractos de acetato de etilo y acetona del zumo de *Punica granatum* L. “granada”. *Rev Estomatol Herediana* [revista de internet]. 2019 [acceso 12 de marzo de 2019]; 25(3); 268-77. Disponible en:

<http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/930>

25. Álvarez M. Comparación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de la *psidium guajava* (guayaba) y *Punica granatum* (granada) sobre el *Streptococcus mutans* estudio in vitro. repositorio [artículo de internet]. 2019 [acceso 13 de marzo 2019]; 3(5):11. Disponible en:

<http://repositorio.unheval.edu.pe/handle/UNHEVAL/3002>

26. Kim YH and Choi EM. Stimulation of osteoblastic differentiation and inhibition of interleukin-6 and nitric oxide in MC3T3-E1 cells by pomegranate ethanol extract. *Phytother. Res.* 2009; 23: 737-739.
27. Sánchez A, Carbonell AA, La fruta granada cultivada en España, Punicalagina antioxidante del zumo de granada y el extracto de granada, en la alimentación funcional del futuro [libro de internet]. 1ª ed. España: editorial content; 2012 [acceso 5 de marzo 2019]. Disponible en:
https://www.zumodegranada.com/wp-content/uploads/2015/09/LIBRO_la-fruta-granada-cultivada-en-Espana-2015.pdf
28. Hamid Reza Rahimia, Mohammad Arastoob and Seyed Nasser Ostad. A Comprehensive Review of *Punica granatum* (Pomegranate) Properties in Toxicological, Pharmacological, Cellular and Molecular Biology Researches. *Iranian J.f.P.R.* 2012; 11 (2): 385-400.
29. Sepulveda L, Buenrostro J. et al. Aspectos fundamentales de los elagitaninos de granada (*Punica granatum* L.). Vol 2. Mexico; 2013. 45-66.
30. Seeram NP, Schulman RN and Heber D. Pomegranates: Ancient Roots to Modern Medicine. Taylor and Francis Group, Boca Raton (2006; 4(8): 5-8.
31. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A and Packer L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 166- 171.
32. Guo S, Deng Q, Xiao J, Xie B and Sun Z. Evaluation of antioxidant activity and preventing DNA damage effect of pomegranate extracts by chemiluminescence. *pubmed.* 2007; 18; 55(8):3134-40.

33. Rahimi HR, Arasoo M and Shiri M. Punica granatum is more effective to prevent gastric disorders induced by Helicobacter pylori or any other stimulator in humans. Asian J. Plan. Sci. 2011; 10: 380-382.
34. Sastravaha G, Gassmann G, Sangtherapitikul P and Grimm WD. Adjunctive periodontal treatment with Centellaasiatica and Punica granatum extracts in supportive periodontal therapy. Acad. Periodontol [revista de internet]. 2005[acceso 5 de marzo 2019]; 7: 70-79. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16022023>
35. Vasconcelos LC, Sampaio MC, Sampaio FC and Higino JS. Use of Punica granatum as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. Mycoses [revista de internet] 2003[acceso 5 de marzo 2019]; 46: 192-196. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12801361>
36. Patel JB, Cockerill III FR, Bradford PA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015; 35(3): 85-9.
37. Reyes. E, Paou. E, Lopez. A. Metodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Temas selectos [revista de internet].2014 [acceso 5 de marzo 2019]; 8(1): 68-78. Disponible en:
<http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>
38. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr Med Chem. 2003; 10(10):813-29.

39. Pellecuer S, Allegrini J, Simeon de Bouchberg M. Huiles essentielles bactericides et fongicides. Revue de l'Institut Pasteur de Lyon [revista de internet]. 2018 [acceso 10 de diciembre 2018]; 9:135-9. Disponible en: <https://www.nutranews.org/fr--aromatherapie-scientifique--les-huiles-essentielles-un-pouvoir-antimicrobien-avere>
40. Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: ¿From "Who Are They?" to "What Are They Doing?". J Dent Res [revista de internet]. 2018 [acceso 12 de diciembre 2018]; 94(12):1628-37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26377570>
41. Gamboa. F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del Streptococcus mutans: experiencias de investigación. Univ. Odontol [revista de internet]. 2018 [acceso 12 de diciembre 2018]; 33(71):65-73. disponible en: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/DialnetIdentificacionYCaracterizacionMicrobiologicaFenoti-5236033%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/DialnetIdentificacionYCaracterizacionMicrobiologicaFenoti-5236033%20(1).pdf)
42. Porte L, Braun J. Streptococcus mutans: A bacteria that honours its name. Rev Chil Infect. [revista de internet]. 2018 [acceso 12 de diciembre 2018]; 26(6): 571. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v26n6/art17.pdf>
43. Barrero L. Microbiología clínica [libro de internet]. 1ª ed. España: Editorial síntesis; 2016 [acceso 18 de abril 2019]. Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
44. Arroyo L paz A. Efecto vasodilatador mediado por oxido de nitrilo de extracto hidroalcohólico de Zea mays L. (maíz morado) en anillos aórticos de rata.

Rev. Perú med. [revista de internet]. 2019[acceso 15 de marzo 2019]
;27(4):527-531. disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v27n4/a06v27n4.pdf>

45. Arroyo J. Actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado (*Zea mays* L.) en ratas. Rev. Perú med. [revista de internet] 2019[acceso 15 marzo 2019]; 25(2):195-199. Disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v25n2/a07v25n2.pdf>

46. Ramírez L. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Tec. [revista en internet]. 2019[acceso 11 de febrero 2019]; 42(15): 263-268. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>

ANEXO 01



FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

FICHA DE OBSERVACIÓN EXPERIMENTAL

Operador:

Investigador:

Fecha: _____ Grupo: _____ Instrucciones:

Consignar los datos obtenidos.

N° Placas	Cantidad de extracto Punica granatum (10 ul)	Cultivo	Concentración 25%, 50%, 75% y 100%	Observaciones a las 24, 48 y 72 (hrs)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				

ANEXO 02



Pueblo Libre, 17 de septiembre de 2019

Mg. Blga AQUIJE DAPOZZO, CARMEN LUISA
Jefa del Laboratorio Central de la Universidad Alas Peruanas

De mi consideración:

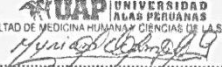
Tengo el agrado de dirigirme a usted para expresarle mi respetuoso saludo y al mismo tiempo presentarle a la egresada **GUTIERREZ ABAD, KARINA**, con código **2009150208**, de la Escuela Profesional de Estomatología - Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud -Universidad Alas Peruanas, quien necesita recabar información en el área que usted dirige para el desarrollo del trabajo de investigación (tesis).

TÍTULO: "EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PUNICA GRANATUM (GRANADA) SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175)"

A efectos de que tenga usted a bien brindarle las facilidades del caso.

Anticipo a usted mi profundo agradecimiento por la generosa atención que brinde a la presente.

Atentamente,


HELBER MYRIAM OCAMPO GUABLOCHE
DIRECTORA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA



ANEXO 03



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



"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

CONSTANCIA N° 320-USM-2019

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

La muestra vegetal (planta con frutos), recibida de **Karina Gutierrez Abad**; estudiante de la Universidad Alas Peruanas, ha sido estudiada y clasificada como: ***Punica granatum* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: MYRTALES

FAMILIA: LYTHRACEAE

GENERO: *Punica*

ESPECIE: *Punica granatum* L

Nombre vulgar: "granada"

Determinado por: Dra. Joaquina Albán Castillo

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

Lima, 07 de octubre de 2019



Joaquina Albán Castillo

Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb

ANEXO 04

MATRIZ DE CONSISTENCIA
 Título: "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PUNICA GRANATUM (GRANADA) SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175) "

Nombre: Gutierrez sbad, Karina

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	VARIABLE E INDICADORES	MUESTRA	METODOLOGIA	BASES TEORICAS	ESTADISTICA
PROBLEMA PRINCIPAL ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) sobre el crecimiento de Streptococcus mutans (ATCC 25175)?	OBJETIVO GENERAL Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) sobre el crecimiento de Streptococcus mutans (ATCC 25175).	HIPOTESIS PRINCIPAL El extracto etanólico de Punica granatum (granada) tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175).	Variable 1: Efecto antibacteriano • KIRBY BAUER	POBLACION Placas Petri MUESTRA Cepas de Streptococcus mutans	Tipo de estudio Investigación experimental Diseño Experimental Nivel cuantitativo Aplicativo Técnica de recolección de datos Fichas Instrumento Ficha de recolección de datos	Punica granatum Propiedades de la Punica granatum Método para evaluar la actividad antimicrobiana Streptococcus mutans y caries dental Medios de cultivo del Streptococcus mutans	Técnica de análisis de resultados Estadística descriptiva
PROBLEMAS SECUNDARIOS ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)? ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)? ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)?	OBJETIVOS ESPECIFICOS Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175).	HIPOTESIS ESPECIFICA El extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). El extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 50% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). El extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 25% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175).	Variable 2: Concentración de extracto de Punica granatum • Cantidad porcentual				

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título: "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PUNICA GRANATUM (GRANADA) SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175) "

Nombre: Gutierrez abad, Karina

<p>(granada) al 75% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175)? ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre la cepa de Streptococcus Mutans (ATCC 25175)? ¿Cuál es el efecto antibacteriano de Punica granatum (granada) en sus diferentes concentraciones a las 24,48 y 72 horas?</p>	<p>(granada) al 75% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) en sus diferentes concentraciones a las 24,48 y 72 horas.</p>	<p>(granada) al 75% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). El extracto etanólico de Punica granatum (granada) al 100% tiene efecto antibacteriano in vitro sobre la cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25175). El efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de Punica granatum (granada) en sus diferentes concentraciones a las 24, 48 y 72 horas.</p>					
---	--	---	--	--	--	--	--

ANEXO 05: FOTOGRAFIAS



Obtención del fruto Ica provincia de Palpa



*Preparación del agar triplicasa de soya:
Se pesó en la balanza analítica y luego se diluyó*



Extracto de Punica granatum diluido con alcohol al 96° y se rotulo en sus porcentajes 100% 75 %50% y 25%



Se preparó los discos de papel filtro, donde se colocaron 10 ul de cada concentración con la ayuda de una pipeta



Activación del *Streptococcus mutans* y sembrado con el hisopo liofilizado en el agar TSA enriquecido con sangre



Agar miuller Hinton pesado en la balanza analítica y diluido con agua estéril



Agar TSA diluido y llevado a la autoclave a 121° durante 15 minutos



Colocación del agar TSA enriquecido con sangre en las placas Petri

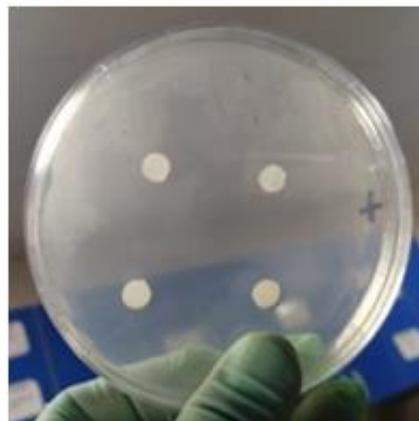
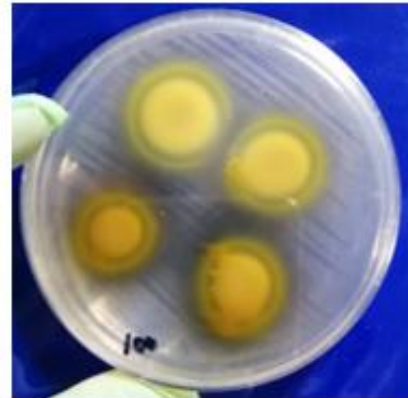
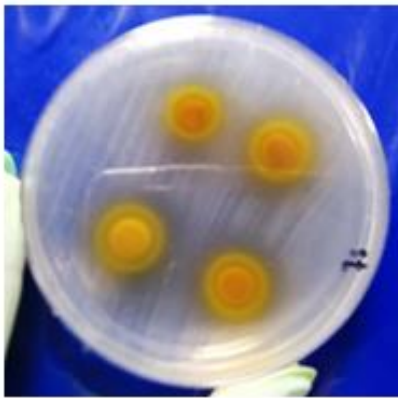
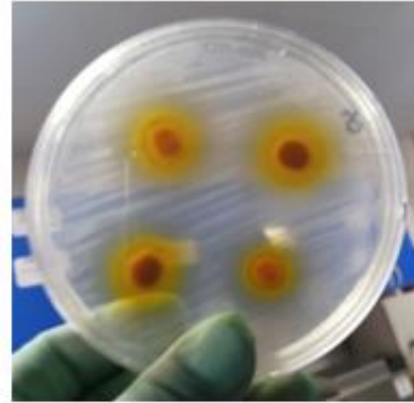
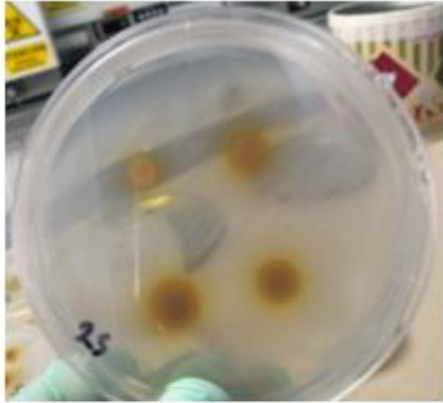


Presencia de Streptococcus mutans diluido con cloruro de sodio, hasta alcanzar la turbidez de Mac Farland 0,5



Sembrado del Streptococcus mutans en agar Mueller Hinton

Lectura de los halos de inhibición a las 24 horas



Lectura de los halos de inhibición a las 48 horas

