

**Luis Padilla
Kamyre Neyra**

**Vladimir Huacasi
Sonia Macedo**

**Efecto antibacterial in vitro
del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L.
sobre cepas de *Streptococcus mutans***

DOI: 10.35622/inudi.b.012



EDITADA POR
INSTITUTO
UNIVERSITARIO
DE INNOVACIÓN CIENCIA
Y TECNOLOGÍA INUDI PERÚ



Luis Padilla

<https://orcid.org/0000-0002-7774-3799>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Kamyre Neyra

<https://orcid.org/0000-0003-4681-7254>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Vladimir Huacasi

<https://orcid.org/0000-0002-2240-4589>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Sonia Macedo

<https://orcid.org/0000-0001-7555-8226>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Efecto antibacterial in vitro del extracto etanolico de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre cepas de *Streptococcus mutans*

DOI: <https://doi.org/10.35622/inudi.b.012>

Luis Padilla

<https://orcid.org/0000-0002-7774-3799>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Kamyre Neyra

<https://orcid.org/0000-0003-4681-7254>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Vladimir Huacasi

<https://orcid.org/0000-0002-2240-4589>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Sonia Macedo

<https://orcid.org/0000-0001-7555-8226>

Con afiliación a la Universidad Nacional del Altiplano, Puno - Puno, Perú

Efecto antibacterial in vitro del extracto etanolico de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre cepas de *Streptococcus mutans*

DOI: <https://doi.org/10.35622/inudi.b.012>

Efecto antibacterial in vitro del extracto etanolico de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre cepas de *Streptococcus mutans*

Luis Alberto Padilla Valenzuela
Kamyre Hillary Neyra Vitulas
Gaelord Vladimir Huacasi Supo
Sonia Caroll Macedo Valdivia
(Autores)

ISBN: 978-612-5069-02-3 (PDF)

Hecho el depósito legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2022-03311

DOI: <https://doi.org/10.35622/inudi.b.012>

Editado por Instituto Universitario de Innovación Ciencia y Tecnología Inudi Perú S.A.C.

Urb. Ciudad Jardín Mz. B3 Lt. 2, Puno – Perú

RUC: 20608044818

Email: editorial@inudi.edu.pe

Teléfono: +51 973668341

Sitio web: <https://editorial.inudi.edu.pe>

Primera edición digital

Puno, abril de 2022

Libro electrónico disponible en

<https://doi.org/10.35622/inudi.b.012>

Editores:

Wilson Sucari / Jannina Quilca / Patty Aza.

Diseño de portada:

David Paucar Condori

Las opiniones expuestas en este libro es de exclusiva responsabilidad del autor/a y no necesariamente reflejan la posición de la editorial.

Publicación sometida a evaluación de pares académicos (Peer Review Doubled Blinded)

Publicado en Perú / *Posted in Peru*



Esta obra está bajo una licencia internacional Creative Commons Atribución 4.0.

CONTENIDO

SINOPSIS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO I.....	15
MARCO TEÓRICO	15
1.1. Investigaciones previas	15
1.2. Streptococcus mutans	17
1.2. Ecología oral.....	19
1.2.1 Caries dental	19
1.2.2. Biofilm.....	21
1.3. Hibiscus sabdariffa L.....	23
1.3.1. Posición taxonómica.....	24
1.3.2. Uso tradicional.....	24
1.3.3. Componentes	24
1.3.4. Toxicidad	25
1.3.5. Fitoterapia.....	25
1.4. Efecto antibacterial	26
1.4.1. Clorhexidina	26
1.4.2. Medios de cultivo	28
1.4.3. Clasificación de los medios de Cultivo	28
CAPÍTULO II.....	29
DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA Y MARCO METODOLÓGICO.....	29
2.1. Descripción de problema.....	29
2.2. Objetivo de la investigación	30
2.2.1. Objetivo general	30
2.2.2. Objetivos específicos.....	30
2.3. Método, diseño y tipo de investigación	31
2.3.1. Ámbito general	31
2.3.2. Ámbito específico.....	31
2.3.3. Periodo de duración	31
2.3.1. Población	31
2.3.2. Muestra	32
2.3.3. Criterios de selección.....	32
2.4. Cuadro de variables, temas o unidades de investigación.....	32

2.5. Técnicas e instrumentos de investigación	33
2.5.1. Análisis estadísticos.....	33
2.5.2. Instrumento.....	33
2.5.3. Materiales	33
2.6. Procedimientos de investigación	35
2.6.1. Elaboración de extracto en concentraciones.....	36
2.6.2. Preparación del medio de cultivo para aislamiento de Streptococcus mutans	36
2.6.3. Lectura de placas y recolección de los resultados	41
2.7. Consideraciones éticas.....	41
CAPÍTULO III	42
EXPOSICIÓN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	42
3.1. Exposición resultados	42
3.1.1. Efecto antibacterial del extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa L. sobre Streptococcus mutans al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el Streptococcus mutans a las 24 horas	42
3.1.2. Efecto antibacterial del extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa L. al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el Streptococcus mutans a las 48 horas.....	44
3.1.3. Comparación de la diferencia del efecto antibacterial del extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa L. al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el Streptococcus mutans a las 24 y 48 horas.....	46
3.1.3. Comparación de la diferencia del efecto antibacterial del extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa L. al 25%, 50%, 75%, y 100% sobre el Streptococcus mutans con el control positivo y el control negativo a las 24 y 48 horas.....	47
3.2. Discusión	49
3.2. Conclusiones.....	54
REFERENCIAS	56
ANEXOS	66

SINOPSIS

La caries dental es una de las enfermedades más frecuentes a nivel mundial y debido a su prevalencia se comenzó a utilizar la fitoterapia como tratamiento alternativo, la *Hibiscus sabdariffa L.* posee gran variedad de propiedades terapéuticas de las cuales en este estudio destaca su actividad antibacterial. Objetivo: El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antibacterial in vitro del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* sobre cepas de *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas. Materiales y métodos: La investigación fue aplicativa de diseño experimental y medición prospectiva. La muestra fue obtenida de pacientes que firmaron el consentimiento informado para así poder obtener las cepas de *Streptococcus mutans*. Se cultivaron en 16 placas Petri y en cada placa se distribuyeron 7 discos de papel filtro N°4, la técnica fue de difusión por disco de Kirby Bauer con pozos, con un total de 112 discos y pozos; las placas Petri se dividieron en 4 grupos de acuerdo a las concentraciones del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* que se obtuvo por maceración con alcohol al 96% para obtener una muestra al 100% extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* y para obtener las concentraciones de 25%, 50% y 75% se utilizó alcohol para realizar las diluciones. Se consideró la clorhexidina al 0.12% como control positivo y al agua destilada como control negativo. Resultados: Se demostró que la *Hibiscus sabdariffa L.* tiene efecto inhibitorio. El mejor efecto se registró a las 48 horas al 100% de concentración. Obteniendo un halo de inhibición de 14.23mm. Conclusión: El extracto etanólico de la *Hibiscus sabdariffa L.* sí tiene efecto antibacterial in vitro sobre las cepas de *Streptococcus mutans*.

Palabras clave: extracto etanólico, hibiscus sabdariffa L., streptococcus mutans.

INTRODUCCIÓN

Una estrategia científica moderna que despertó interés en todo el mundo es la investigación de plantas en beneficio de la salud, por lo que se está acumulando evidencias que demuestren la efectividad de las propiedades medicinales de las plantas como agentes terapéuticos en la farmacología (1), que sean útiles en diferentes patologías.

El Perú tiene una diversa variedad de plantas medicinales por el cual es importante investigar los efectos terapéuticos, existen muchas especies con propiedades medicinales aún por descubrir, variedades de plantas por analizar con posibles efectos farmacológicos que son de gran importancia para la prevención y el tratamiento en odontología (2).

En Puno región no se han encontrado estudios sobre el uso de extractos etanólicos a base de *Hibiscus sabdariffa L.* y su actividad antibacteriana que comprueben las propiedades medicinales y la actividad antibacterial sobre el *Streptococcus mutans*, por lo que el presente estudio tiene como objetivo demostrar la efectividad antibacterial y tiene por finalidad demostrar que los resultados puedan ser utilizados en la práctica clínica para la prevención de enfermedades orales en beneficio de nuestros pacientes.

Para el logro del objetivo se realizó este estudio con un grupo experimental de extracto etanólico en diferentes porcentajes de concentración (25%, 50%, 75% y 100%) en comparación con un grupo control positivo con clorhexidina al 0,12% y un grupo control negativo con agua destilada.

La importancia del libro radica en abordar el tema de la fitoterapia en el ámbito de la odontología, considerando que el uso de plantas medicinales hoy en día tiene mayor relevancia por ser de mayor accesibilidad y bajo costo.

Este estudio fue realizado con la finalidad de evidenciar el efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ya que actualmente no se encuentra muchas investigaciones a nivel nacional a fin de que estos resultados puedan servir para formular nuevos

proyectos que aporten más conocimientos sobre la flor de Jamaica; ya que esta planta es conocida, recomendada y muy consumida en la región por diferentes males que afronta la población.

Lo estudiado también servirá para comparar con los antiguos y nuevos estudios que se realizan sobre el efecto antibacterial de la flor de Jamaica no solo sobre la cepa mencionada, sino sobre diferentes tipos de bacterias.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Investigaciones previas

Diversas investigaciones se realizaron en relación con el tema presentado, tal es el caso de Baena S, Piloni J, Santos E, Gómez C, Rangel E, Castro J. (2019) quienes compararon la efectividad de enjuagues comerciales, clorhexidina y extracto de *Hibiscus Sabdariffa L.* con etanol, metanol y acetona en Tulancingo Hidalgo-México. Se tuvo como muestra cepas de bacterias de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aerus*, *Streptococcus sanguinis* y *Capnocytophaga gingivalis* y mostraron que los enjuagues bucales tienen un efecto antibacteriano menor que *Hibiscus sabdariffa L.* extractos y clorhexidina. (10).

Por su parte Machmud E. (2018) en Indonesia hizo un estudio de diseño experimental donde analizó la efectividad de las tabletas efervescentes de *Hibiscus sabdariffa L.* inhibiendo el crecimiento de colonias de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* en placas de resina acrílica y demostraron que las tabletas efervescentes de *Hibiscus sabdariffa L.* Encontró que las tabletas efervescentes de *Hibiscus sabdariffa L.* son efectivas en la prevención de colonias de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* como la efectividad con las tabletas efervescentes de perborato de sodio (11).

En Indonesia el estudio de Febriyanti I, Dewi I, Indriyani R, Christiono S. (2018) en Banjarmasin con diseño cuasi experimental buscaron conocer el efecto de los pétalos de Jamaica como solución alternativa para identificar la placa dental y realizado por Indriyani L, Dharmautama M. (2016) en su estudio de diseño experimental en el que buscaron probar el extracto inhibitorio de la flor de Jamaica con una concentración de 2.5%, 5%, 7.5% y 10% contra *Porphyromonas gingivalis* (bacterias Gram negativas) y *Streptococcus sanguis* (bacterias grampositivas). Encontraron un efecto significativo de la concentración de extracto de pétalos de Jamaica al 100% como una solución reveladora alternativa para determinar la placa dental (12). Así como que el extracto de etanol de las flores de Jamaica es eficaz para inhibir tanto las bacterias grampositivas como las

bacterias gramnegativas (13).

Riaz G, Chopra R. (2018) luego de una revisión bibliográfica de la fitoquímica y uso terapéutico de *Hibiscus sabdariffa L.* concluyen que la *Hibiscus sabdariffa L.* y sus componentes son importantes en la prevención de enfermedades crónicas y degenerativas asociadas con el estrés oxidativo (6). Asimismo, Hassan S, Berchová K, Šudomová M. (2016) encontraron que la *Hibiscus sabdariffa L.* y sus fitoquímicos contienen un rico perfil bioactivo responsable de su eficacia terapéutica, como antocianinas, flavonoides, polisacáridos y ácidos orgánicos que incluyen málico, ascórbico, hidroxycítrico e Hibisco ácido. Además, es rico en minerales como el hierro y el calcio con un bajo contenido de glucosa (15). La *Hibiscus sabdariffa L.* tiene propiedades antidiabéticas, antioxidantes, anticancerígenas, antiparasitaria, antifúngicas, antipiréticas, antiinflamatorias, antihipertensivas y antianémica. Es así que las hierbas son la fuente natural de la medicación y no tiene efectos secundarios, muchas de las cuales tienen potencial de inhibir los colonizadores de placa primarios y podrían usarse como agentes anti placa (7), (19) .

Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakasawa F. (2016). Hokkaidō determinan el efecto del extracto de cáliz de *Hibiscus Sabdariffa L.* sobre la viabilidad in vitro y la capacidad de formación de biopelículas de bacterias patógenas orales, concluyendo que el extracto de cáliz de *Hibiscus sabdariffa L.* puede usarse para prevenir enfermedades orales (14). Mohamed E. (2016). evaluó la eficacia antibacteriana de la Roselle sudanesa (*Hibiscus sabdariffa L.*). concluyendo que el extracto de metanol de la *Hibiscus sabdariffa L.* contiene agentes antibacterianos eficaces que revelaron una considerable zona de inhibición contra todas las bacterias Gram positivas y Gram negativas utilizadas en el estudio (16).

Chandra B, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. (2015). realizaron una revisión bibliográfica de 10 tipos de extractos plantas sobre la caries dental y los microorganismos de la placa, evidenciando que el uso de extractos herbales para el control de enfermedades bucodentales se considera una alternativa interesante a los antimicrobianos sintéticos debido a su menor impacto negativo y para superar la resistencia al fármaco durante la terapia (17).

Riwandy A, Aspriyanto D, Budiarti L. (2014). Banjarmasin realizaron un estudio de diseño experimental en la que determinaron la actividad antimicrobiana del extracto de agua de *Hibiscus sabdariffa L.*, donde concluye que las sustancias activas contenidas en los extractos de agua de la flor en diversas concentraciones pueden producir efectos antibacterianos (18).

Naa Agowa P. (2014). Acra valoró la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y acuoso en 6 concentraciones contra aislados clínicos de bacterias. Encontró que los cálices y las hojas de la planta podrían utilizarse para la producción de agentes antimicrobianos que inhibirían significativamente el crecimiento de bacterias (20). Morales M, Hernandez J, Leiva G, Salinas Y, Soto L y Elencoro J. (2013) agregan que los extractos de etanol tuvieron el mayor efecto antimicrobiano sobre la *Salmonella choleraesuis* (21).

Maciel M, Pinto M, Chaves H, Wiest J. (2012) demostraron que la actividad antimicrobiana del extracto alcohólico de cálices es mayor que la del extracto alcohólico de frutos con semillas. Sin embargo concluyen que ambas partes de la planta tiene compuestos antimicrobianos que inhiben el crecimiento de microorganismos (22). Afolabi O, Ogunsola F, Cocker A. (2008) determinaron que *Garnicia kola* y *Hibiscus sabdariffa L.* tienen efecto antibacteriano directo sobre *Streptococcus mutans* (23).

En Perú Encarnación M, Esquivel K. (2018) concluyen que la *Hibiscus sabdariffa L.* tiene efecto antibacteriano similar en comparación con la Clorhexidina 0.12% sobre el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (1).

1.2. *Streptococcus mutans*

El *Streptococcus mutans* fue aislado e identificado por Clarke, en 1924, a partir de lesiones cariosas en humanos (3). Son bacterias Gram positivas, tienen forma de coco que se distribuyen normalmente en cadenas o pares. Destacan por ser excelentes fermentadores de azúcares, productoras de ácido y la mayoría anaerobias facultativas (24).

El género se divide en 8 grupos de los cuales los orales se encuentran en 6 de ellos.

Son el grupo de microorganismos más extenso involucrados en la enfermedad, precisamente en las lesiones del esmalte y dentina. Las comunidades recolectadas a partir de lesiones caries de dentina contienen especies acidogénicas y acidófilas (25).

Los factores de virulencia cariogénicos del *Streptococcus mutans* incluyen la capacidad de adherirse y formar biofilm en la superficie del diente, metabolizar carbohidratos y generar ácidos (acidogenicidad); y sobrevivir en medios con bajo pH (aciduricidad) (26)(27).

Este género forma parte de los colonizadores primarios de la pieza dental. Esto es debido a que poseen adhesinas específicas como los antígenos I/II que se unen a otras glicoproteínas del huésped presente en el esmalte (24).

El *Streptococcus mutans* es altamente acidogénico, en un medio con disponibilidad de azúcares fermentables puede ser capaz de disminuir el pH oral de 7 a 4,2 en 24 horas aproximadamente (28).

La elevada producción de ácidos es a causa de la capacidad de metabolizar rápidamente azúcares fermentables. También es acidófilo, debido a que su desarrollo es mejor en un medio ácido debido a que produce mecanismos de tolerancia al ácido (24).

La capacidad para formar biopelículas de *Streptococcus mutans* se debe a que posee dos grupos de mecanismos para producir glucanos extracelulares, uno dependiente de la sacarosa y otro independiente. Dentro del grupo dependiente de la sacarosa, las glucosiltransferasas desempeñan un papel crítico en el desarrollo virulento de la placa dental y son encargados de la formación de glucanos a partir de la biotransformación de la sacarosa (29).

Los glucanos sintetizados conceden la posibilidad de adhesión bacteriana al esmalte dental y microorganismos entre sí. Algunos glucanos sintetizados son insolubles brindando a la biopelícula un lugar sólido de anclaje y protección extra frente a agentes externos, incluidos antibacterianos (29).

Otro tipo de unión es gracias a la proteína C de la superficie celular que se asocia a la virulencia del organismo para el desarrollo de caries dental y participa en la adherencia bacteriana. Existen también algunas proteínas de unión al colágeno, presente en algunas cepas de *Streptococcus mutans* que favorecen su unión a este componente orgánico que se encuentra en elevada proporción en la dentina (30).

1.2. Ecología oral

La ecología incluye la relación entre organismos y su ambiente, el papel y contribuciones de estos en la naturaleza y en los ciclos biológicos y ecológicos que mantienen en equilibrio los eventos que ocurren en un determinado ambiente (3).

El microbiota oral se caracteriza por ser compleja en géneros y especies. La mayoría de investigadores coinciden en que existen más de 600 especies bacterianas que habitan en la cavidad oral (3).

La mayor parte de la flora oral tiene la característica de ser transitoria. En poblaciones mínimas y en estado de equilibrio, casi todas las bacterias que habitan la cavidad oral son inocuas. Sin embargo, cuando la población crece se rompe el equilibrio, las bacterias se convierten en autores con potencial virulento que da inicio a la enfermedad (3).

La caries dental es producto de un desequilibrio en el ecosistema oral que lleva al predominio de una flora patógena y uno de los principales es el *Streptococcus mutans* (3).

1.2.1 Caries dental

La caries dental ha sido considerada tradicionalmente como una enfermedad infecciosa, causada por microorganismos específicos. Entonces era necesario remover el tejido dañado y bacterias causantes (31).

De acuerdo con Black, era necesaria “la remoción de las bacterias cariogénicas del tejido dental afectado y posterior a eso complementar con una restauración”. Este

principio no es compatible con la concepción actual de la caries dental: “enfermedad producto de un desequilibrio ecológico (disbiosis) (32)(5)(33)(34), causado por el aumento de la ingesta de carbohidratos fermentables que lleva a un desbalance en la composición y la actividad en el biofilm y la pérdida mineral causada por los ácidos bacterianos (31), es decir está relacionado con el crecimiento de biopelículas microbianas en la superficie del diente causado por una dieta rica en sacarosa (35).

El proceso de la caries una secuencia dinámica interacciones diente/biofilm en una superficie dentaria. Este proceso causa desbalance entre factores que protegen (remineralización) y factores destructivos (que desmineralizan) a favor de la desmineralización de la superficie dental dicho proceso puede ser detenido en cualquier momento (31), si la lesión es aún reversible (32).

Una vez afectado el tejido dental se distinguen una lesión caries activa y una lesión de caries detenida, si es activa, en un período específico de tiempo se desmineraliza, es decir, la lesión está progresando (31).

Nyvad y Ekstrand propusieron bases para distinguir la lesión de caries activa de la lesión de caries detenida: apariencia visual, sensación táctil y acumulación de placa (31).

Cuando la lesión de caries es activa, la superficie se torna amarillenta o blanquecina, opaca, y se siente áspera a la exploración y puede estar cubierta de placa gruesa y posteriormente la dentina es blanda a la exploración. La lesión se ubica en una zona retentiva: surcos y fisuras, cerca del margen gingival, apicalmente al punto de contacto (31).

Cuando la lesión de caries es detenida, la desmineralización no avanza, la superficie del esmalte es de color oscuro pero tal superficie es brillante, se siente dura y lisa a la exploración. En las caras libres, la lesión se localiza a una distancia del margen gingival. La dentina es brillante, dura a la presión (31).

1.2.2. Biofilm

Es una entidad polimicrobiana que reside en las superficies bióticas y abióticas de la cavidad bucal (36); las células que lo habitan muestran niveles mucho más altos de resistencia antimicrobiana (37).

Está formado por polímeros extracelulares que favorecen la adherencia y envuelven a las agrupaciones bacterianas. Las bacterias que se adhieren a la pieza dentaria mediante proteínas y glicoproteínas procedentes de la saliva y otras secreciones orales, se denominan colonizadoras primarias. Existen también bacterias que se adhieren posteriormente, a estas bacterias se llamas colonizadoras secundarias (24).

El biofilm es un ecosistema dinámico debido que su composición y actividad varía en función de las condiciones fisiológicas del individuo. Otro factor determinante del biofilm es su actividad metabólica que se caracteriza por las enzimas extracelulares que los microorganismos vierten al exterior y que tienen funciones específicas como por ejemplo degradar los azúcares, sustratos del metabolismo bacteriano, favoreciendo al desarrollo y mantenimiento de dicha biopelícula (24). Durante la erupción dental, el biofilm se desarrolla en las superficies dentales expuestas, las cuales están cubiertas por una película amorfa, casi invisible formada principalmente por glicoproteínas presentes en la saliva. Si la higiene oral es deficiente, las superficies dentales acumulan grandes masas microbianas, mientras tanto en las superficies de la mucosa oral la descamación de células epiteliales no permite acumulación (24).

El proceso de formación del biofilm oral puede resumirse en 5 etapas principales:

- Formación de la película adquirida: tras la limpieza, el diente queda cubierto por una capa de glicoproteínas salivales, por un fenómeno de adsorción. Esta película adquirida es de espesor variable (0,1 y 3µm) y presenta alto contenido de grupos carboxilo y sulfatos, lo que incrementa la carga negativa del esmalte.
- Colonización bacteriana: fijación de las bacterias.
- Co-agregación de otras especies bacterianas.
- Multiplicación y formación de la biopelícula.

- Maduración de la placa: creación de una matriz extracelular compleja formada por glucanos solubles e insolubles, fructanos y hetero polímeros que crean un ambiente favorable para la biopelícula (24).

En los colonizadores primarios destacan las bacterias Gram positivas, que forman enlaces iónicos específicos, de tipo hidrofóbicos o lectinas; este último es un enlace molecular entre una proteína de la superficie de la bacteria y carbohidratos de la matriz.

Como ejemplo de primeros colonizadores típicos tenemos el género *Streptococcus spp.* que se une interactuando con sustratos de las superficies dentarias como restos de albúmina, proteínas ricas en prolina, mucinas o ácido siálico. Otros colonizadores primarios podrían ser lactobacilos y el género *Actinomyces spp.*, con posterior aparición de otras bacterias Gram negativas anaerobias (25).

A los colonizadores primarios se agregan otros microorganismos en forma de estratos, dándose un fenómeno de coagregación. El tipo de unión entre los microorganismos es muy amplio destacando el uso de adhesinas, glicoproteínas específicas y lectinas. Además, hay otro tipo de interacciones como el “quorum sensing” que hace referencia a la autorregulación de la expresión genética de los microorganismos que forman la biopelícula en respuesta a la densidad de población. Ejemplos de colonizadores secundarios serían *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Veilonella atypica*, y algunos lactobacilos. El número de especies que pueden llegar a estar implicadas en el biofilm cariogénico es muy variable en función del individuo y la localización de la lesión. Así pues, la diversidad bacteriana media asciende a unas 177 especies en el caso de la caries de esmalte, 251 en la caries de dentina expuesta al exterior y 201 en la caries de dentina oculta (25).

El pH bajo causado por la fermentación de los carbohidratos, selecciona la población de cepas acidógenas y acidúricas tales como del grupo *mutans* (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrius* y *Lactobacilos spp.* (31).

El *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguis* los que presentan adhesinas que tienen afinidad por la película salival adquirida y proteasas las cuales no son producidas por los *Streptococcus mutans* (31).

El metabolismo y propiedades de difusión de la biopelícula se debe a la calidad y cantidad del flujo salival, los hábitos dietéticos, la higiene y el contenido de fluoruros.

Una vez dentro de la biopelícula las bacterias son metabólicamente activas y causan fluctuaciones del pH los cuales causan una pérdida de minerales cuando el pH desciende menos a 5,5 o ganancia de ellos cuando el pH aumenta. Los resultados de esta desmineralización y remineralización pueden conducir a la disolución de los tejidos duros y a la formación de la lesión de caries (31).

1.3. *Hibiscus sabdariffa* L.

También conocida como Jamaica, es una planta perenne del género *Hibiscus* y forma parte de la familia Malvaceae. Es originaria de India y Malasia pero gracias a que puede crecer en suelos de baja fertilidad y escasa humedad su cultivo se realizó en China, Tailandia, Indonesia, Arabia, Vietnam, Sudan, Egipto, Nigeria y México (38). Es una planta herbácea anual propia de climas secos subtropicales, montañosos, de matorral espinoso (39).

Es conocida como planta de siembra anual, erecta, arbustiva, envuelta de ramas, por lo general sus tallos pueden llegar a medir hasta 2.4 m de altura. Sus hojas son de color verde de tipo aserradas y agudas con venas rojizas y peciolo de 7.5 a 12.5 cm de longitud; sus flores de color amarillo con centro de color rosa a rojo marrón el cual va cambiando a rosado a medida que pasa el tiempo hasta secarse (40).

La flor es una de las partes más importantes de la planta, debido a que es la más utilizada por los consumidores, es considerable recalcar que son hermafroditas, solitarias axiales, y muchas veces aumentan en racimos terminales, es muy notorio su resistencia ya que se muestra muy carnosa. Su color blanco se muestra en su corola con un centro rojizo en su columna estaminal, mediante su

maduración el cáliz se prolonga y se muestra roja con 4 o 5 sépalos y con una longitud apreciable de espinas que bordean la flor y el tallo (41).

1.3.1. Posición taxonómica

- Reino: *Plantae*
- Sub reino: *Tracheophyta*
- División: *Anthophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Subclase: *Dilleniidae*
- Orden: *Malvales*
- Familia: *Malvaceae*
- Género: *Hibiscus*
- Especie: *Sabdariffa Linn*
- Nombre común: Rosa o flor de Jamaica

1.3.2. Uso tradicional

Los usos son culinarios, medicinales, cosméticos y botánicos. En el aspecto culinario se utiliza para bebidas frías y calientes, bebidas fermentadas, vinos, mermeladas, jaleas, helados, chocolates y tortas. En el aspecto medicinal se ha demostrado efectos diuréticos, analgésicos, antitusivos, disminuye también la viscosidad y disminuye el azúcar en la sangre (42), estimula el peristaltismo intestinal, reduce la temperatura corporal (38)(43), disminuye el colesterol, alivia el insomnio, enfermedades de la piel (44). También se utilizó para tratar enfermedades nerviosas, cardiovasculares, obesidad, trastornos hepáticos, control de la hipertensión arterial (38).

1.3.3. Componentes

El componente principal de la roselle en el contexto de la importancia terapéutica es un polisacárido, ácido orgánico y flavonoides principalmente antocianinas (6) tiamina, niacina (8). El ácido orgánico incluye el ácido málico, ácido cítrico y ácido ascórbico (45).

Los polifenoles y flavonoides aumentan el valor nutritivo de la roselle por su

propiedad antioxidante. El contenido fenólico en la planta consiste principalmente en antocianinas y flavonoides como eugenol (6)(38).

El color tradicional que lo caracteriza se debe al contenido de antocianinas y el ácido de su sabor se debe al ácido cítrico, málico, tartárico e hibisco. La propiedad terapéutica se debe al contenido de compuestos bioactivos como los ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, ácidos orgánicos y polisacáridos. En las flores se encuentra principalmente antocianinas, flavonoides, ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido de hibisco y ácido málico), glucósidos y fibra y en cuanto a los cálices posee la misma proporción de ácidos orgánicos y antocianinas, pero hay baja cantidad de flavonoides y glucósidos (38)(43).

Los beneficios terapéuticos se les atribuyen principalmente a las antocianinas, ácidos fenólicos y flavonoides (43).

1.3.4. Toxicidad

En diversas investigaciones se ha descrito que *Hibiscus sabdariffa L.* tiene un bajo grado de toxicidad aguda, identificando que su coadministración con fármacos puede provocar un ascenso de los efectos secundarios, conllevando al fracaso en cuanto a su acción terapéutica (40).

También se demostró que su toxicidad depende de la dosis, entre 300 a 2000mg/kg durante 3 meses (46).

1.3.5. Fitoterapia

La fitoterapia corresponde a una rama de la investigación médica dedicada al análisis de la efectividad de las plantas medicinales, medicamentos y preparados vegetales para el tratamiento de enfermedades. A lo largo de la historia las plantas fueron utilizadas como remedios naturales debido a la ausencia de fármacos sintéticos (47).

En nuestra región ya se han reportado el uso de plantas medicinales con efectos antisépticos, antibacterianos y analgésicos con efectos positivos en la inhibición del crecimiento bacteriano y así prevenir enfermedades orales.

1.4. Efecto antibacterial

Es la capacidad que tienen los antimicrobianos naturales o sintéticos de suprimir el crecimiento o destruir microorganismos como el *Streptococcus mutans* teniendo en cuenta que se necesita también de un control mecánico de la biopelícula por medios físicos para evitar enfermedades orales (48).

Debido al uso indiscriminado de antibióticos comerciales, la resistencia por parte de los microorganismos está aumentando, así como la aparición de efectos adversos de ciertos antibióticos, ha llevado a investigar nuevas alternativas antimicrobianas a partir de plantas consideradas medicinales, los estudios realizados hasta la actualidad demuestran la efectividad que tienen las plantas frente a los agentes antimicrobianos (49).

En la actualidad contamos con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de sustancias sintéticas. Estos métodos aplicados en el ámbito hospitalario son el de difusión de discos KirbyBauer, el método de pozos en agar y método de dilución en tubos (turbidimétrico) para hallar no sólo la potencia sino también la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos (50).

Se demostró que las antocianinas tienen actividad antibacteriana debido a que alteran la pared celular bacteriana, los flavonoides provocan la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la inhibición de la biopelícula, inhibición de ADN girasa y la inhibición de la función de la membrana. Se descubrió también que el ácido de hibisco inhibe el crecimiento bacteriano, alterando la permeabilidad de la membrana (51).

Los extractos etanólicos de la *Hibiscus sabdariffa L.* tienen efecto antibacterial contra *Streptococcus mutans* y además tienen actividad antifúngica (51)(6).

1.4.1. Clorhexidina

En la odontología es el antiséptico de elección para el control de la placa por ser un agente de amplio espectro con pocos efectos secundarios, como también es muy usado en restauraciones con el fin de eliminar la formación de bacterias

provocando caries secundaria, para la irrigación y desinfección de los conductos radiculares. La clorhexidina puede ayudar en muchas otras situaciones y áreas de la salud como agente antiséptico (52).

Químicamente pertenece a las biguanidas, las cuales presentan un amplio espectro antimicrobiano, es decir tiene acción antibacterial, antiviral y antifúngica (53). Descubierta en la década de los 50 en Inglaterra por científicos accidentalmente durante un estudio contra la malaria (54)(52), fue presentada en 1954 y está reconocido por la ADA como agente antimicrobiano (54).

Se reportó su baja toxicidad en mamíferos, afinidad con la piel, membranas y mucosas. Esto llevo al desarrollo y aplicación como antiséptico para piel y mucosas, en heridas leves y para uso odontológico (55).

Mecanismo de acción

Su amplio espectro incluye varios tipos de bacterias: Gram positivas, Gram negativas, anaerobias, aerobias y, en menor proporción, contra hongos y levaduras.

Tiene efecto bacteriostático cuando se encuentra en bajas concentraciones debido a que solo llega adherirse a la membrana celular bacteriana y tiene efecto bactericida en altas concentraciones debido a que es capaz de ingresar a la célula destruyendo su membrana y provocando la precipitación del citoplasma, causando así la muerte celular (52).

También tiene efecto anti placa, impidiendo la formación de biofilm o destruyendo la placa ya formada (54).

Una de las más importantes características es la sustantividad, la cual provoca la unión a superficies de la cavidad oral y posteriormente actúa como una reserva de liberación lenta pudiendo tener actividad antimicrobiana luego de su absorción (54).

Tiempo de acción

Su nivel de acción es intermedio, inicia a los 30 segundos y se recomienda tres minutos previos al inicio del procedimiento según los fabricantes. Sin embargo, su actividad residual de hasta 6 horas (55).

Efectos adversos

Puede provocar la pigmentación de las superficies dentarias, materiales restauradores, y mucosas, altera el sentido del gusto, provoca la descamación de la mucosa, escasas reacciones alérgicas, reducción de la flora bucal y puede provocar resistencias si se utiliza durante largos períodos de tiempo (54)(52). Se ha descrito también la tumefacción de la glándula Parótida (55).

1.4.2. Medios de cultivo

Es una solución equilibrada de todos los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo y reproducción de microorganismos de laboratorio, en el comercio profesional existe una variedad de medios de cultivo utilizados para cultivar microorganismos en laboratorio (56).

Los medios de cultivo reproducen artificialmente el hábitat y brindan las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos, no todas las bacterias crecen con los mismos medios nutricionales (57).

1.4.3. Clasificación de los medios de Cultivo

Líquidos

Denominados comúnmente como “caldos”, están constituidos por nutrientes en una solución acuosa, es utilizado con mayor importancia en la conservación de los microorganismos. Por ejemplo: tripticasa de soja (56).

Sólidos

Denominados comúnmente como “agar”, se obtienen al agregar una sustancia gelificante como el agar al 2% a un medio líquido. Por ejemplo: agar Mitis Salivarius y Agar Mueller Hinton (56).

Semisólidos

Son medios de cultivo líquidos con el agregado de agar al 0.3% o 0.5% (56).

CAPÍTULO II

DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA Y MARCO METODOLÓGICO

2.1. Descripción de problema

El *Streptococcus mutans* es el microorganismo más importante en la formación de caries dental. Es un coco Grampositivo, anaerobio facultativo. Se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dentaria, debido a que requiere la presencia del tejido duro para colonizar (3).

Todas las superficies de la cavidad bucal están colonizadas por una microflora residente que está en equilibrio con los tejidos bucales conocido como homeostasis. La microflora residente es beneficiosa para el hospedador y protege los tejidos contra la colonización por microorganismos exógenos que pueden ser patógenos. Si se altera la homeostasis en la biopelícula dental, puede conducir al desarrollo de caries (4).

Aunque la caries dental es causada por disbiosis microbiana, el *Streptococcus mutans* es la especie patógena predominante. Se ha demostrado que una reducción o eliminación de esta bacteria previene o reduce la progresión de la caries (5).

La *Hibiscus sabdariffa L.* es rica en fitoquímicos como los polifenoles, especialmente antocianinas, los polisacáridos, ácidos orgánicos, demostrando una enorme posibilidad de un uso terapéutico moderno (6).

Cuenta con la presencia de compuestos bioactivos, muestra actividad antiinflamatoria, actividad antimicrobiana, actividad antidiabética, actividad anti-obesidad y antihipertensiva (7). Además sus ingredientes naturales tienen bajos efectos secundarios (8).

Esta hierba se comenzó a utilizar debido a sus beneficios para la salud, la porción que se toma para el consumo son los pétalos de las flores rojas. El té de flor de Jamaica es una bebida agria que puede afectar la secreción de las glándulas

salivales, y así optimizar las funciones de la saliva en beneficio de las piezas dentarias (9).

Los estudios fitoquímicos y farmacológicos han validado muchos usos tradicionales de la flor de Jamaica. Se ha demostrado que la posee compuestos bioactivos que son eficaces para mejorar diversas enfermedades. Su consumo es seguro en dosis bajas sin ningún efecto adverso en el hígado o los riñones. Por lo tanto, puede usarse como alimento (6).

Por todo lo mencionado este proyecto busca saber si ¿Existe un efecto antibacterial in vitro del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre cepas *Streptococcus mutans*?

2.2. Objetivo de la investigación

2.2.1. Objetivo general

- Determinar el efecto antibacterial in vitro del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre cepas de *Streptococcus mutans* Puno 2020

2.2.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 horas.
- Determinar el efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 48 horas.
- Comparar la diferencia del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas.
- Comparar la diferencia del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. al 25%, 50%, 75%, y 100% sobre el *Streptococcus mutans* con el control positivo y el control negativo a las 24 y 48 horas.

2.3. Método, diseño y tipo de investigación

- **Según el nivel de investigación:** Explicativo porque buscó el porqué de los hechos mediante la relación de causa - efecto (59).
- **Según el diseño de estudio:** Experimental debido a que el manejo de la variable independiente de forma intencional (60).
- **Según la cronología de las observaciones:** Longitudinal porque se realizó más de una medición de la muestra (60).
- **Según el número de mediciones:** Prospectivo porque la recolección se realizó una vez aceptado el proyecto (60).

2.3.1. *Ámbito general*

El departamento de Puno está ubicado al extremo sur este del Perú a orillas del Lago Titicaca, entre los 13°00'00" y 17°17'30" de latitud sur y los 71°06'57" y 68°48'46" de longitud oeste del meridiano de Greenwich; cuenta con una extensión territorial de 71 999,0 km² siendo el quinto departamento más grande en el ámbito nacional. Limita por el norte con la región Madre de Dios, por el este con el país de Bolivia, por el sur con la región Tacna y el país de Bolivia y por el oeste con las regiones de Moquegua, Arequipa y Cusco (58).

2.3.2. *Ámbito específico*

- Laboratorio de Operaciones y procesos unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.
- Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

2.3.3. *Periodo de duración*

Esta investigación titulada “Efecto antibacterial in vitro de extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. sobre cepas de *Streptococcus mutans* Puno 2020”, se realizó desde el mes de mayo hasta el mes noviembre del año 2021 haciendo un total de siete meses como periodo de duración.

2.3.1. *Población*

Cepas de *Streptococcus mutans* obtenidas de molares cariados de 5 pacientes que acudieron a un consultorio particular llamado “Belladentis” ubicado en av. Laykakota N° 147 2do piso de la ciudad de Puno.

2.3.2. Muestra

Cepas de *Streptococcus mutans* sembradas en agar sangre para luego ser incubadas a 37°C por 24 hora en caldo nutritivo de Tripticasa de soja, con la finalidad de que los microorganismos recolectados se desarrollen en mayor cantidad y puedan multiplicarse.

2.3.3. Criterios de selección

Criterios de inclusión

Placas con siembra correcta de *Streptococcus mutans*

Criterios de exclusión

- Placas contaminadas por otros microorganismos.
- Placas mal procesadas.

2.4. Cuadro de variables, temas o unidades de investigación

Efecto antibacterial in vitro del extracto etanólico de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> – Puno 2020				
VARIABLES	DEFINICIÓN	INDICADOR	SUB INDICADOR	ESCALA
Variable independiente				
<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Planta originaria del África que se cultiva por sus grandes propiedades medicinales y se le conoce también con el nombre de flor de Jamaica (16)	Concentraciones	25ml de extracto etanólico y 75ml de alcohol etanólico al 96%.	25%
			50ml de extracto etanólico y 50ml de alcohol etanólico al 96%.	50%
			75ml de extracto etanólico y 50ml de alcohol etanólico al 96%.	75%
			100ml de extracto etanólico y 50ml de alcohol etanólico al 96%.	100%
Variable dependiente				
Efecto antibacterial	Toda sustancia que pueda suprimir el crecimiento de microorganismos o destruirlos (57)	Kirby Bauer	Escala de Duraffourd. -Nula > 0 – a 8mm -Sensible = a 9 – 14mm -Muy sensible = a 15 – 19mm -Sumamente sensible= > 20mm	Diámetro del halo de inhibición Milímetros (mm)

Variable interviniente				
Tiempo	Tiempo transcurrido desde la aplicación del tratamiento.	Horas	24	Horas
			48	

2.5. Técnicas e instrumentos de investigación

2.5.1. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó estadística descriptiva (tablas, medias, gráficos) e inferencial (ANOVA y Tukey).

2.5.2. Instrumento

- Documental: ficha de recolección de datos
- Mecánico: Vernier calibre manual de escala dual 78-201 Stanley ®

2.5.3. Materiales

- 3kg de Hibiscus sabdariffa L.
- Mortero
- Balanza analítica
- Probeta
- Pipeta digital
- Embudo de vidrio
- Vaso de precipitado
- Botella ámbar de 500ml
- Papel aluminio
- Hisopos estériles
- Tubos de ensayo
- Pabilo
- 5 pliegos de papel Kraft
- Placas Petri
- Incubadora
- Cocina eléctrica

- Matraz Erlenmeyer
- Autoclave
- Mechero
- Papel filtro
- Sacabocado
- Caja de anaerobiosis
- Pinzas
- Algodón
- Hipoclorito de sodio al 4%
- Jabón carbólico
- Esponja
- Vernier de calibre manual
- Velas

Equipo básico de bioseguridad

- Mandil blanco
- 01 caja de guantes descartables
- 01 caja de barbijos
- 01 caja de gorros descartables
- Protector facial

Medios de cultivo y soluciones

- Agar nutritivo
- Agar Mitis Salivarius
- Agar Mueller Hinton sangre al 5%
- Caldo tripticasa de soja
- Clorhexidina al 0.12%
- Agua destilada
- Alcohol al 96%

2.6. Procedimientos de investigación

Obtención de Hibiscus sabdariffa

- Se obtuvieron los pétalos de la planta en el mercado Unión y Dignidad de la ciudad de Puno.
- Se trasladaron los pétalos en bolsas no translúcidas hacia el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios (LOPU) de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano Puno.

Preparación del extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa L.

- Lo primero fue seleccionar los pétalos secos más conservados, se descartó las impurezas y pétalos dañados. Se pesaron los pétalos ya seleccionados obteniendo un total de 3Kg.
- Las hojas fueron colocadas en el horno de desecación por 24 horas a 40°C para eliminar microorganismos que pudieran contaminar la muestra seleccionada.
- Al retirar los pétalos del horno se colocaron en una caja de anaerobiosis para impedir la contaminación y rehidratación durante el traslado.
- Se pesaron 150mg de los pétalos en una balanza analítica para luego ser triturados con ayuda de un mortero antes de calcular la masa requerida.
- En un pomo ámbar con ayuda de un embudo de vidrio se depositó 150mg de los pétalos triturados y luego se agregó 450 ml de alcohol etanólico al 96%. Se tapó el envase de forma hermética y se envolvió con papel aluminio.
- Para una mejor disolución, el pomo ámbar que contenía el producto de maceración se mantuvo en refrigeración constante agitándose el mismo por 5 min todos los días durante 15 días.
- La maceración tuvo que ser filtrada para obtener únicamente contenido líquido, para lo cual, se utilizó papel filtro (1).
- El método de filtración fue por gravedad obteniendo un extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa L. al 100% de pureza (57).

2.6.1. Elaboración de extracto en concentraciones

- Para obtener una concentración del 25% se utilizó 25ml de extracto etanólico y 75ml de alcohol etanólico al 96%.
- Para obtener una concentración del 50% se utilizó 50ml de extracto etanólico y 50ml de alcohol etanólico al 96%.
- Para obtener una concentración del 75% se utilizó 75ml de extracto etanólico y 25ml de alcohol etanólico al 96%.
- Para obtener una concentración del 100% solo se utilizó 100ml de extracto etanólico (61).

2.6.2. Preparación del medio de cultivo para aislamiento de Streptococcus

mutans

Obtención de la muestra

- Se obtuvo la muestra de las piezas dentarias posteriores con caries de 5 pacientes.
- La muestra fue colocada en un tubo de ensayo previamente esterilizados a calor seco, el mismo que fue sellado con papel aluminio y papel Kraft.
- En cada tubo de ensayo se agregó 5mL de suero fisiológico al 0.9% como medio de transporte de la muestra.
- Una vez obtenida las muestras se colocaron en tubos de ensayo y se volvieron a tapar con papel aluminio para luego ser transportado directamente al laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana.
- Para la obtención de la muestra se seleccionó a pacientes previa firma del consentimiento informado, en un consultorio privado. Estos pacientes deberían tener más de 18 años, no tener enfermedad sistémica y tener piezas dentarias con caries.

Preparación del medio de cultivo Agar sangre

- Se seleccionó agar nutritivo y agua destilada.
- La proporción de los ingredientes fueron calculadas según las indicaciones del fabricante.
- Se mezcló el agar nutritivo con el agua destilada en un matraz y fue sellado con papel aluminio y colocado a la autoclave.

- Se esterilizo en la autoclave a 121°C a 15 libras de presión/pulgada por 15 minutos.
- Luego de retirar el matraz se debe dejar enfriar hasta llegar a una temperatura de 45 – 50°C aproximadamente; llegando a esta temperatura se agrega sangre en la cantidad de 5% del total del agar preparado.
- Una vez mezclada la solución se vertió de forma homogénea en 5 placas Petri y se dejó gelificar a temperatura ambiente el agar.

Siembra de las muestras

- Se destapó cuidadosamente el tubo de ensayo que contenía la muestra y se sumergió un hisopo estéril dentro de la suspensión del microorganismo en estudio.
- Se colocó el hisopo estéril por encima del nivel del contenido del tubo para rotarlo contra las paredes del mismo con el fin de remover el exceso del inóculo.
- Se sembró el inóculo sobre la superficie del agar sangre con el hisopo estéril en tres diferentes direcciones evitando así inóculos muy concentrados o muy diluidos.
- Se dejó reposar entre 5 a 20 minutos con las 5 placas Petri cerradas.
- Una vez realizada la siembra se incubo a 37°C por 24 horas en anaerobiosis y 24 horas en aerobiosis, pasado este tiempo se observaron los resultados y se seleccionaron las placas que presentaban mayor desarrollo de colonias.

Observación y recolección de la cepa

- Se utilizó la tinción de GRAM con cristal violeta, Lugol, alcohol acetona y safranina.
- Se realizó un frotis con la muestra en una lámina portaobjetos, se fijó al calor y se dejó enfriar.
- Se colocó la lámina portaobjeto en una bandeja de coloración, se agregó en el área del frotis gotas de cristal violeta y se mantuvo así durante un minuto.
- Se lavó la lámina con agua destilada y se agregó Lugol al frotis dejándolo reposar.
- Se enjuagó con agua destilada y el siguiente paso fue la agregación de alcohol acetona para poder decolorar la muestra.

- Se enjuagó y agrego safranina durante un minuto para luego volver a lavar con agua destilada.
- Se examinó la lámina coloreada al microscopio con un objetivo de 100X de inmersión.
- Al identificar los microorganismos se transportaron las cepas seleccionadas en tubos de ensayo que contenían caldo de Tripticasa de soja para ser colocados en una incubadora por 24 horas a 37°C.
- Transcurridas las 24 horas se realizó nuevamente la identificación microscópica con la tinción Gram con el fin de estar seguros que es la cepa bacteriana indicada.

Preparación del caldo nutritivo para la replicación

- Según las indicaciones del fabricante se preparó el caldo nutritivo de Tripticasa de soja para desarrollo y almacén de las cepas.
- Del Agar sangre se recolecto los microorganismos para colocarlas en tubos de ensayo que contenían el caldo nutritivo.
- Luego se puso en la incubadora a 37°C por 24 horas con la finalidad de que los microorganismos recolectados se desarrollen en mayor cantidad y puedan multiplicarse.

Preparación del medio de cultivo selectivo Agar Mitis Salivarius

- Se preparó Agar Mitis Salivarius por ser un medio de cultivo selectivo para el crecimiento del *Streptococcus mutans* (62).
- El preparado fue según la proporción indicada por el fabricante y la cantidad de placas a utilizar.
- Se pesó el agar y se procedió a diluir en agua destilada mientras calentaba sobre una cocina eléctrica para ayudar a la dilución.
- Al estar diluido completamente se selló la boca del matraz y se colocó en autoclave durante 15 minutos luego de alcanzar la temperatura de 121°C.
- Se retiró el medio selectivo de la autoclave, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 45-50°C aproximadamente y se distribuyó el agar en 5 placas Petri esterilizadas.
- Cuando el medio de cultivo gelifico, se sembró la cepa que estaba en el caldo de cultivo.

- Luego de realizar el sembrío se almacenó las placas Petri en una caja de anaerobiosis y se incubó la cepa durante 24 horas a 37°C en anaerobiosis y 24 horas en aerobiosis.
- Posterior al sembrío en el medio de cultivo selectivo se observó nuevamente microscópicamente y se determinó una cepa de *Streptococcus mutans* al 99% de pureza.

Preparación del agar Mueller Hinton sangre al 5%

- Se preparó agar Mueller Hinton con 5% de sangre según las indicaciones del fabricante.
- Se pesó el Agar y se procedió a diluir en agua destilada en un matraz mientras calentaba sobre una cocina eléctrica para llegar a la dilución.
- Al estar diluido completamente se selló la boca del matraz y se colocó en autoclave durante 15 minutos luego de alcanzar la temperatura de 121°C.
- Una vez autoclavado el medio de cultivo se dejó enfriar y se distribuyó en 16 placas Petri.
- Se dejó gelificar a temperatura ambiente.
- Luego del proceso de gelificación se procedió a la siembra de las cepas por el método de agotamiento, realizando líneas en forma de estrías en tres direcciones diferentes para lograr una distribución uniforme.
- Después de 10 minutos de haber realizado la siembra se aplicó el método de difusión KirbyBauer con pozos.
- Se realizaron los pozos en agar con un sacabocado y se distribuyeron discos de papel filtro estéril N°4 en cada uno de los pozos, haciendo un total de 7 discos por cada placa Petri (Se colocó 6 discos en cada pozo en la periferia del agar y 1 en el centro de la placa), distribuidos con una distancia mínima de 20 mm entre cada pozo (el diámetro de los discos según las normas del INS fue de 6 mm).
- Las placas fueron agrupadas en grupos de 4 (25%, 50%, 75% y 100%).
- En cada una de las placas se distribuyó los discos de papel filtro y se inoculó el extracto etanólico de la *Hibiscus sabdariffa* L. en los 6 pozos de la periferia de la placa.

- Los controles positivo y negativo fueron inoculados en el centro de cada placa; en cada grupo de 4 placas se colocaron: en 3 de ellas el control positivo y en la restante el control negativo.
- Se hizo un total de 96 pozos que contenían 10 microlitros del extracto etanólico, 12 pozos con 10 microlitros del control positivo (Clorhexidina al 0.12%) y 4 pozos con 10 microlitros del control negativo (agua destilada) con ayuda de una pipeta electrónica.
- Terminado el proceso de inoculación se colocaron las placas en una caja de anaerobiosis y se almacenó en la incubadora a una temperatura de 37°C durante 24 horas procediendo después a la recolección de datos.
- Pasadas las 24 horas y luego de recolectar los datos se dejó incubando 24 horas más para hacer el control de 48 horas.

Prueba de susceptibilidad microbiana por el método de discos de difusión de Kirby Bauer pozos

- Las pruebas de resistencia o susceptibilidad antimicrobiana, se realizaron mediante la técnica de difusión de disco en agar de Kirby Bauer con pozos (63).
- Esta técnica permitió medir la susceptibilidad in vitro de *Streptococcus mutans* frente al extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* con potencial antibacterial.
- Una cantidad específica del extracto fue vertido a los discos (64).
- El tratamiento se difundió desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición.
- Posterior a ello se realizó la medición de los halos y las medidas resultantes fueron comparadas con los valores de sensibilidad sugeridos por la Escala de Duraffourd según los diferentes diámetros de inhibición estos valores se clasificación en: no sensibles o nula donde el diámetro es 8mm; sensibles donde el diámetro esta entre el rango de 9 - 14mm; muy sensible, donde el diámetro esta entre el rango de 15 – 19mm y sumamente sensible cuando el diámetro es mayor a 20mm (65).

2.6.3. Lectura de placas y recolección de los resultados

- Durante la recolección de datos, con ayuda de un Vernier de calibre manual y con iluminación desde la parte posterior de la placa Petri, se realizó 3 veces la medición del halo inhibitorio por cada disco y cada una de las concentraciones del *extracto etanólico de Hibiscus sabdariffa L.*
- De igual manera se registraron los datos del control positivo y negativo.
- Se registraron todos los datos a las 24 y 48 horas en la ficha de recolección de datos.

2.7. Consideraciones éticas

- Solicitud dirigida al Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno (Anexo C)
- Constancia de elaboración del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios (Anexo E)
- Solicitud dirigida al Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno (Anexo G)
- Constancia de ejecución de proyecto en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno (Anexo I)
- Constancia de identificación de especie de *Hibiscus sabdariffa L.* (Anexo B)
- Certificación de la cepa bacteriana
- Consentimiento informado (Anexo F) el cual fue firmada voluntariamente por los pacientes conociendo el propósito del estudio y el uso de la muestra que se tomó.

CAPÍTULO III

EXPOSICIÓN DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Expone los resultados considerando en primer lugar los objetivos específicos y en seguida el objetivo general.

3.1. Exposición resultados

3.1.1. Efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* sobre *Streptococcus mutans* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 horas

Tabla 1. Efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 horas.

PRUEBA ESTADISTICA DE t	25%	50%	75%	100%
PROMEDIO	9.36 mm	10.42 mm	12.59 mm	13.77 mm
DESVIACION ESTANDAR	± 0.13	± 0.16	± 0.31	± 0.20
LIMITE INFERIOR	9.31 mm	10.35 mm	12.46 mm	13.69 mm
LIMITE SUPERIOR	9.42 mm	10.48 mm	12.72 mm	13.85 mm
T _{CALCULADA}	340.94	317.72	199.53	339.24
PROBABILIDAD	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Prueba estadística: ANOVA				P <0.05

Fuente: Propio de los investigadores

INTERPRETACIÓN

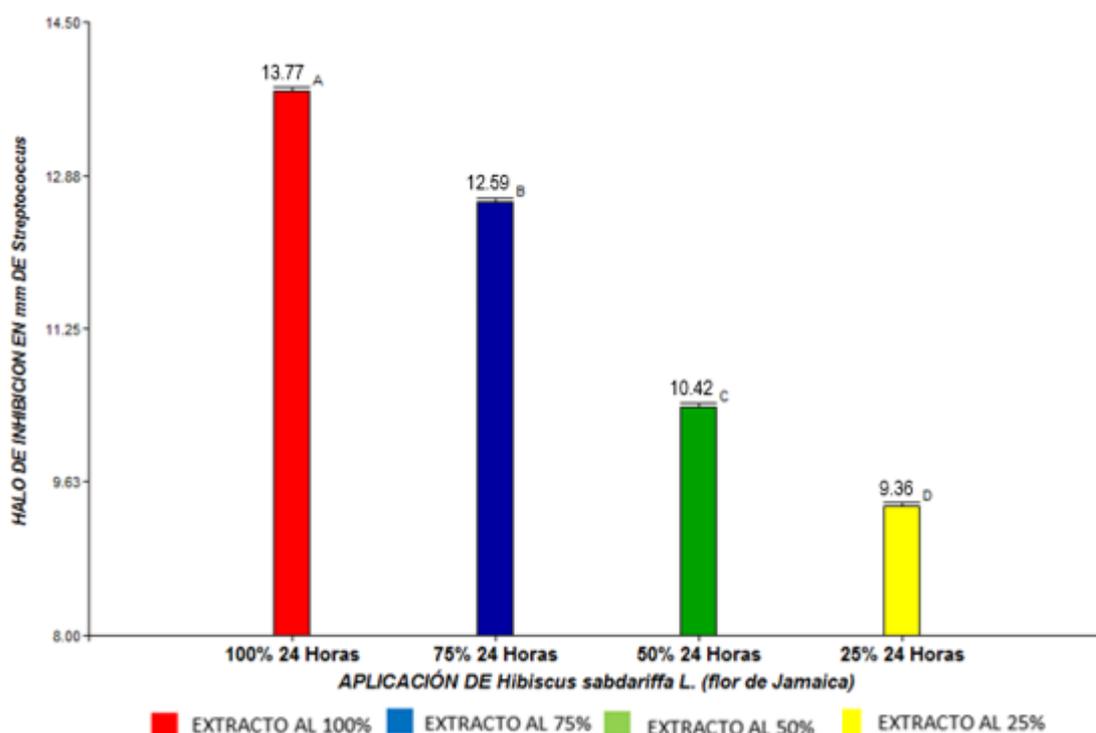
En la tabla 1 se observa que el extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 100% a las 24 horas presenta un halo de inhibición de mayor promedio (13.77 mm) en comparación con las concentraciones del 75%, 50% y 25%, siendo menor a medida que disminuye la concentración del extracto. En cuanto a la desviación estándar se observa un valor mayor en la concentración al 75% (± 0.31) debido a

la dispersión de los datos recolectados en comparación de las otras concentraciones, siendo la de 25% la que presenta menor valor en la DE (± 0.13)

Al análisis de la prueba t de Student, se encontró que los datos presentan una distribución normal de acuerdo con los límites inferior (LI) y superior (LS) y con un valor de $p=0.0001$, no existiendo dispersión de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición.

Los datos también fueron sometidos a la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) por lo que la aplicación del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. (flor de Jamaica) en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% frente a la bacteria *Streptococcus mutans* presentan una diferencia significativa con un C.V. = 1.83 y una probabilidad de $p < 0.0001$, por lo que se sometió a la prueba estadística de contraste de Tukey que se observa en el diagrama de barras (alfa = 0.05, DMS = 0.15980 y gl = 92). Según la escala de Duraffourd y los promedios obtenidos a las 24 horas el *Streptococcus mutans* es sensible al 25% (9.31mm), 50% (10.42mm), 75% (12.59) y 100% (13.77).

Figura 1. Efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 horas.



Fuente: Propio de los investigadores

3.1.2. Efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 48 horas

Tabla 2. Efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 48 horas.

PRUEBA ESTADISTICA DE t	25%	50%	75%	100%
Promedio	9.72 mm	10.76 mm	13.30 mm	14.23 mm
Desviación estándar	± 0.19	± 0.13	± 0.26	± 0.21
Límite inferior	9.64 mm	10.71 mm	13.19 mm	14.14 mm
Límite superior	9.80 mm	10.82 mm	13.41 mm	14.32 mm
T _{CALCULADA}	256.31	412.23	250.18	339.51
PROBABILIDAD Prueba estadística: ANOVA	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

Fuente: Propio de los investigadores

INTERPRETACIÓN

En la tabla 2 se observa que el extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 100% a las 48 horas presenta un halo de inhibición de mayor promedio (14.23mm) en comparación con las concentraciones del 75%, 50% y 25%, siendo menor a medida que disminuye la concentración del extracto.

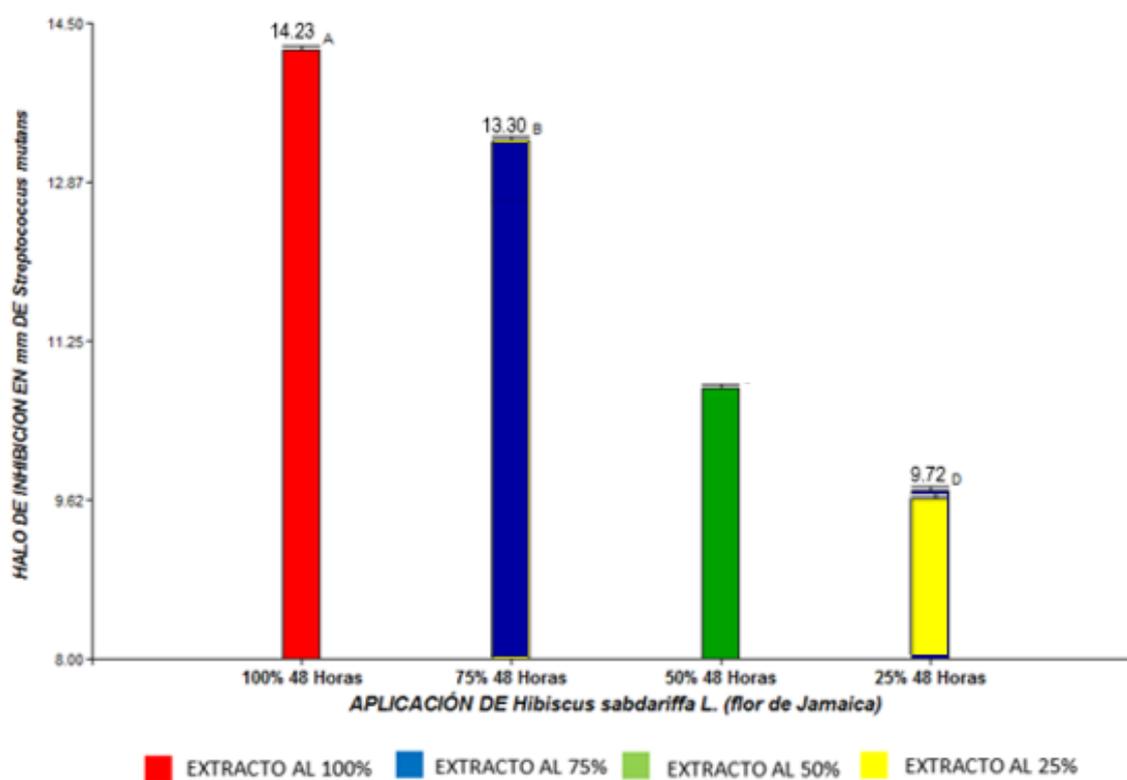
En cuanto a la desviación estándar se observa un valor mayor en la concentración al 75% (± 0.26) debido a la dispersión de los datos recolectados en comparación de las otras concentraciones, siendo la de 25% la que presenta menor valor en la de (±0.19)

Al análisis de la prueba t de Student, se encontró que los datos presentan una distribución normal de acuerdo con los límites inferior (LI) y superior (LS) y con un valor de $p=0.0001$, no existiendo dispersión de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición.

Los datos también fueron sometidos a la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) por lo que la aplicación del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. (flor de Jamaica) en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% frente a la bacteria *Streptococcus mutans* presentan una diferencia significativa con un C.V. = 1.67 y una probabilidad de $p < 0.0001$, por lo que se sometió a la prueba estadística de contraste de Tukey que se observa en el diagrama de barras (alfa = 0.05, DMS = 0.15146 y gl = 92).

Según la escala de Duraffourd y los promedios obtenidos a las 24 horas el *Streptococcus mutans* es sensible al 25% (9.72mm), 50% (10.76mm), 75% (13.59) y 100% (14.23).

Figura 2. Efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 48 horas.



Fuente: Propio de los investigadores

3.1.3. Comparación de la diferencia del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas.

Tabla 3. Comparación del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas.

Fuente: Propio de los investigadores

CONCENTRACION	25%	50%	75%	100%
PROMEDIO A LAS 24 HORAS	9.36	10.42	12.59	13.77
PROMEDIO A LAS 48 HORAS	9.72	10.76	13.30	14.23

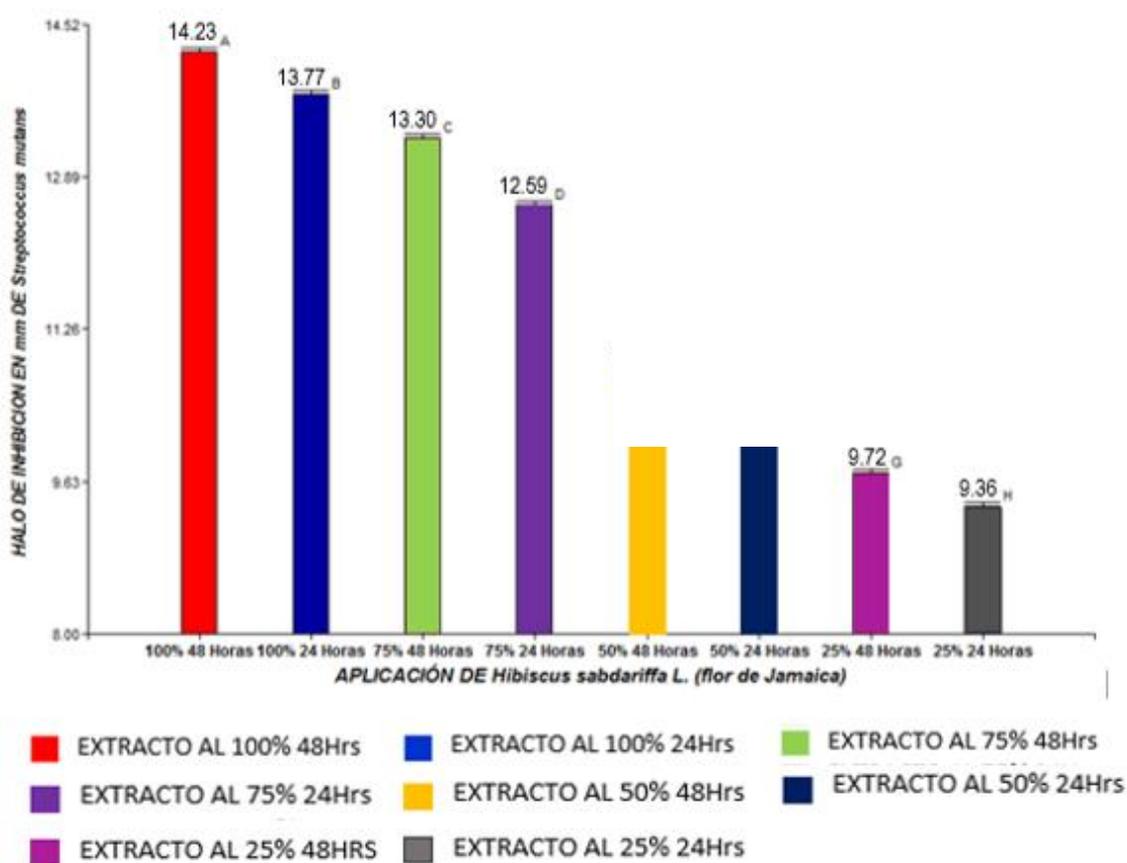
Prueba estadística: ANOVA

INTERPRETACION:

En la tabla 3 se observa que los promedios a las 48 horas son mayores que a las 24 horas lo que demuestra que a mayor tiempo mayor es el efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* sobre el *Streptococcus mutans*.

Los datos fueron sometidos a la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) por lo que la aplicación del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* (flor de Jamaica) en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% frente a la bacteria *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas, presentan una diferencia significativa con un C.V. = 1.75 y una probabilidad de $p < 0.0001$, por lo que se sometió a la prueba estadística de contraste de Tukey que se observa en el diagrama de barras (alfa = 0.05, DMS = 0.18072 y $gl = 184$).

Figura 3. Comparación del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas.



Fuente: Propio de los investigadores

3.1.3. Comparación de la diferencia del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75%, y 100% sobre el *Streptococcus mutans* con el control positivo y el control negativo a las 24 y 48 horas.

Tabla 4. Comparación del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* con el control positivo y el control negativo a las 24 y 48 horas.

Aplicaciones	Control (+)	Control (-)	25%	50%	75%	100%
Promedio 24 horas	18.03	0	9.36	10.42	12.59	13.77
Promedio 48 horas	18.25	0	9.72	10.76	13.30	14.23
Porcentaje 24 horas	100%	0	51.91%	57.79%	69.82%	76.37%
Porcentaje 48 horas	100%	0	53.26%	58.96%	72.87%	77.97%

Prueba estadística: ANOVA

Fuente: Propio de los investigadores.

INTERPRETACION:

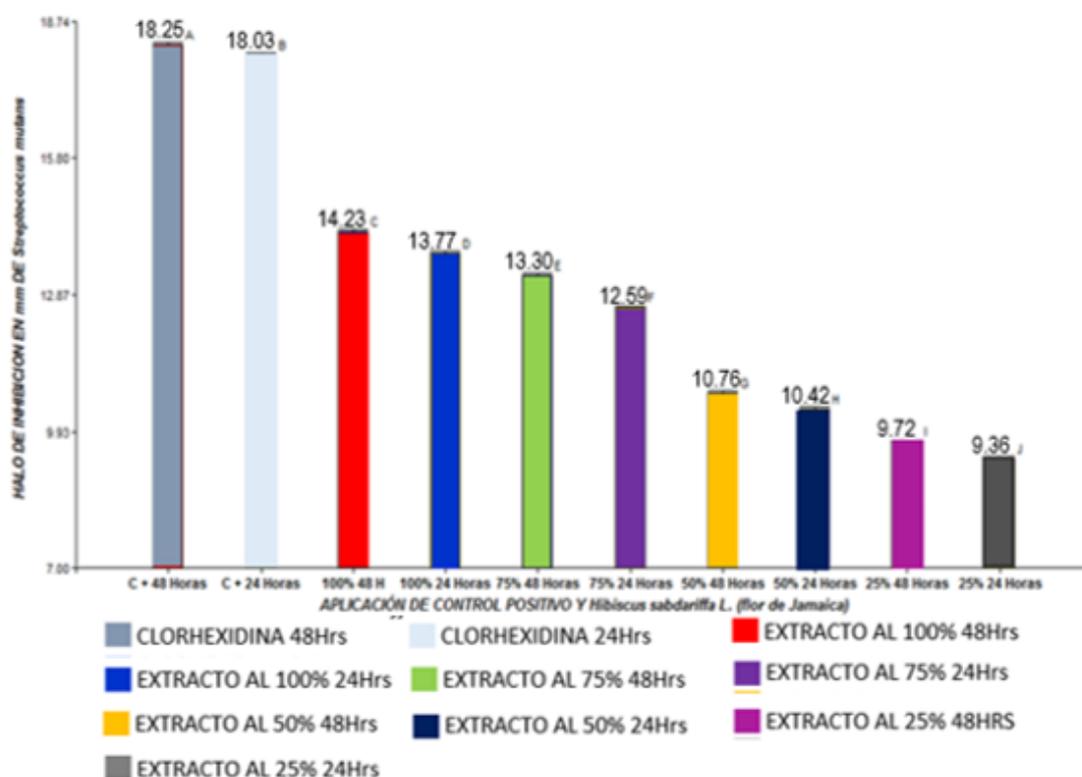
Los resultados del efecto de inhibición del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75%, 100% y control positivos a las 24 y 48 horas, frente a la bacteria *Streptococcus mutans*, teniendo el mayor halo de inhibición con el control positivo con un promedio de 18.25 mm a las 48 horas que representa el 100% de la actividad antimicrobiana, en relación de la aplicación del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 100% tiene mejor actividad antibacteriano siendo su halo de inhibición de 14.23 mm de promedio, con 77.97% de efectividad en relación al control positivo (clorhexidina 0.12%). El menor efecto antibacteriano es en la concentración de 25% a las 24 horas con un promedio de 9.33 mm y un 51.95% de efectividad en relación al control positivo a las 24 horas.

Los datos también fueron sometidos a la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) por lo que la aplicación del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* (flor de Jamaica) en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% frente a la bacteria *Streptococcus mutans* presentan una diferencia significativa con un C.V. = 1.58 y una probabilidad de $p < 0.0001$, por lo que se sometió a la prueba

estadística de contraste de Tukey que se observa en el diagrama de barras (alfa = 0.05, DMS = 0.18843 y gl = 230).

Según la escala de Duraffourd y los promedios obtenidos a las 24 horas el *Streptococcus mutans* es sensible al 25% (9.72mm), 50% (10.76mm), 75% (13.59), 100% (14.23), muy sensible al control positivo (18.03 a las 24 horas y 18.25 a las 48 horas) y presenta sensibilidad nula al control positivo (0mm)

Figura 4. Comparación del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* con el control positivo y el control negativo a las 24 y 48 horas.



3.2. Discusión

La *Hibiscus sabdariffa L.* más conocida en el Perú como flor de Jamaica es una planta anual, típica de clima seco subtropical de montaña, se caracteriza por tener flores rojas en la base y más claras en los extremos, contienen cálices carnosos que suelen ser de color rojo oscuro. Se utilizan principalmente por su efecto antimicrobiano, antifúngico en diferentes tipos de enfermedades, por su efecto hipotensor, a su acción como vaso-relajante, también como colorante alimentario

y jarabes. Los resultados evidenciados en estudios realizados con el extracto de los cálices son numerosos (55).

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto antibacterial in vitro del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* sobre cepas de *Streptococcus mutans*, utilizando 4 concentraciones diferentes al 25%, 50%, 75% y 100% comparada con Clorhexidina al 0.12% como control positivo y agua destilada como control negativo, todos estos medidos y evaluados en 24 y 48 horas.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus Sabdariffa L.* frente a *Streptococcus mutans* fue mayor a las 48 horas en comparación a las 24 horas obteniendo el mayor halo de inhibición de la clorhexidina al 0,12% como control positivo con un promedio de 18.25 mm (100% de efectividad) a las 48 horas, seguido de la aplicación del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 100% que obtuvo un halo de inhibición de 14.23 mm (77.97% de efectividad) , al 75% se obtuvo un halo de inhibición de 13.30 mm (72.87% de efectividad) y al 25% se obtuvo un halo de inhibición de 9.72 mm (53.26% de efectividad).

Por todo lo investigado y demostrado se acepta la hipótesis planteada que indica que el extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* tiene efecto antibacterial sobre el *Streptococcus mutans*.

En 2016 Mohamed (17) en su investigación sobre la eficacia antibacteriana del extracto de *Hibiscus sabdariffa L.* sobre 8 tipos de cepas, realiza el extracto coincidiendo con la metodología que utilizamos para su extracción con la diferencia de utilizar metanol al 80% y la maceración solo por 3 días. Los resultados se tomaron a las 24 horas donde se obtuvieron los diámetros de halos de inhibición para *Pseudomonas aeruginosa* 15.5mm, para *Escherichia coli* 14,5mm, para *Klebsiella pneumonia* 17,5mm, para *Salmonella enteric* 17,5mm, para *Proteus vulgaris* 14,5mm, para *Staphylococcus aureus* 18,5mm, para *Staphylococcus epidermidis* 17,5mm y para *Bacillus cereus* 13,5 mm; ninguno de estos datos se pueden comparar a los datos obtenidos en este estudio vistos en la (TABLA 1) sobre el *Streptococcus mutans*, pero se asemeja con 13.77 mm de diámetro de halo de inhibición para la

concentración al 100% tomada a las 24 horas con el *Bacillus cereus*. Si consideramos los valores de Mohamed comparados con los datos de la (TABLA 2) de nuestra investigación podemos valorar que también hay similitud con 13.30mm de diámetro de halo de inhibición para la concentración al 75% con el *Bacillus cereus* y 14.23mm de diámetro de halo de inhibición para la concentración al 100% con *Escherichia coli* y *Proteus vulgaris* ambas tomadas a las 48 horas. También Chandrashekar y col. en 2014 (23) Tomaron en cuenta 10 diferentes tipos de plantas para realizar la investigación donde el extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* midió 7.42mm de diámetro de halo de inhibición para el *Streptococcus mutans*, 6.50mm de diámetro de halo de inhibición para *Streptococcus sanguis* y 9.75mm de diámetro de halo de inhibición para *Streptococcus salivarius*; todos estos datos tomados una sola vez y en una sola concentración comparado con los resultados que se muestran en la (TABLA 1) de nuestra investigación tomadas a las 24 horas obteniendo 9.36mm de diámetro de halo de inhibición, estos valores se aproximan al 25% de concentración de nuestro estudio. De igual forma Morales y col en 2013 (19) con su estudio de la influencia de la variedad y la actividad antibacteriana de la *Hibiscus sabdariffa L.* sobre las cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella choleraesuis* en la que considero 5 tipos de variedades de la planta tomadas de diferentes partes de México, pero todas cosechadas a la misma vez. Se obtuvo resultados diferentes en la que se encuentra una marcada diferencia entre todas las variedades que se recolectaron obteniendo el mayor diámetro del halo de inhibición la variedad de Alma blanca con 24.5 mm y el menor diámetro del halo de inhibición la variedad de Tecoaapa con 13.2mm todos estos tomados sobre la *Salmonella typhimurium*. Así mismo para la *Salmonella choleraesuis* el mayor diámetro de halo de inhibición lo tuvo la variedad de Alma blanca con 20.2mm y el menor diámetro del halo de inhibición la variedad de Tecoaapa con 14mm. Los datos de nuestro estudio sobre *Streptococcus mutans* fueron de 14.23mm a las 48 horas como mayor diámetro de halo de inhibición no alcanzando los valores que genero la variedad de Alma blanca. Se obtuvo también 13.30mm a la concentración de 75% y 14mm a la concentración de 100% de extracto etanólico a las 48 horas este resultado se puede comparar con el diámetro de halo de inhibición que genero la variedad de Tecoaapa para *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella choleraesuis*.

Siguiendo estos principios en 2017 Encarnación y col (1) compararon el efecto antibacteriano entre el extracto de *Hibiscus sabdariffa L.* sobre el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* medidos y evaluados en el tiempo de 24, 48 y 72 horas. Los resultados de la concentración al 70% a las 24 horas tuvieron diámetro de halo de inhibición de 21.40mm, a las 48 horas de 23 mm que comparados con nuestros datos sobre el *Streptococcus mutans* a la concentración de 75% se obtuvo los diámetros de halo de inhibición de 12.59mm a las 24 horas y 13.30mm a las 48 horas. Estos resultados pueden ser a causa de las características de cada bacteria, ya que el *Streptococcus mutans* es un colonizador primario, mientras que el *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* un colonizador secundario (67). Pero a diferencia de Indriani y col en 2016 (21) que realizaron un estudio del efecto inhibitorio sobre las *Porphyromonas gingivalis* que también es un colonizador secundario se obtuvo un diámetro de halo de inhibición fue de 11.013mm que se compara con nuestro resultado obtenido al 50% con un halo de inhibición de 10.42 a las 24 horas. Existen diferencia debido a que en estas investigaciones se utilizaron diferentes tipos de metodología, así como diferentes concentraciones de alcohol etanólico utilizado en la preparación del extracto etanólico de la *Hibiscus sabdariffa L.*

Naa Agowa en 2014 (18) valoro la actividad antimicrobiana del extracto etanólico 6 concentraciones (0 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml) de la *Hibiscus Sabdariffa L.* contra aislados clínicos de bacterias, Los resultados para 200 mg/ml de extracto etanólico obtuvieron un diámetro de halo de inhibición sobre *Staphylococcus aureus* de 18.33mm. Nuestros resultados sobre *Streptococcus mutans* medidas a las 24 horas y 48 horas no alcanzan los valores en ninguna de las concentraciones que realizamos teniendo como diámetro de halo de inhibición 13.77 mm a la concentración de 100% a las 24 horas y 14.23mm de diámetro de halo de inhibición a la concentración de 100% a las 48 horas debido a que en nuestra investigación solo utilizamos los pétalos de la *Hibiscus sabdariffa L.* y etanol al 96% mientras que Agowa utilizó cálices, hojas y raíces con un litro y medio de etanol al 70%.

Respaldando todos los estudios realizados en 2016 Singh y col (7). realizaron una revisión bibliográfica en la que buscaron las propiedades farmacológicas de la *Hibiscus sabdariffa L.* donde demostraron que contiene efectos antibacterianos principalmente contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aerus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia mascencies*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, Bacilo aerus, y también efectos antiinflamatorios, actividad anti-obesidad y actividad antihipertensiva De igual manera en 2018 Riaz y col (6) en la revisión que realizaron en todos los artículos en los que aparecía la *Hibiscus* hasta el año 2017 encontraron que sus propiedades fitoquímicas y usos terapéuticos que presenta la flor ejerce actividad antioxidante, antiinflamatoria, anti obesidad, antihipertensiva, diurética, antimicrobiana, anticancerígena y hepatoprotectora.

Debido al aumento de enfermedades infecciosas, la población opta por el uso indiscriminado de antibióticos, por lo cual los microorganismos responsables de las enfermedades desarrollan resistencia a variedad de antibióticos comerciales. El uso de las plantas medicinales ha sido siempre una alternativa de solución, en un principio se utilizaba por la falta de fármacos sintéticos y en estos tiempos se utiliza como alternativa debido a los efectos adversos que causan los microorganismos. Por lo tanto, el propósito de este estudio es elaborar una sustancia que ayude a la prevención de enfermedades orales con remedios naturales al alcance de las personas y también para el uso odontológico como antisépticos para realizar distintos tratamientos en beneficio de nuestros pacientes.

En nuestra región no se han encontrado estudios sobre el uso de extractos etanólicos a base de *Hibiscus sabdariffa L.* y su actividad antibacteriana que comprueben las propiedades medicinales y la actividad antibacterial sobre el *Streptococcus mutans* utilizando solo los pétalos ya que en otros estudios les dan más importancia a otras partes de la flor.

La limitación más grande que tuvo el presente trabajo de investigación fue la pandemia que estamos atravesando, primero, porque estuvimos expuestos al covid-19, segundo, porque debido al miedo muchos pacientes, optaron por no

colaborar con nuestro estudio y tercero porque no había personal en el laboratorio para realizar la investigación por lo cual tuvimos que esperar meses para poder ejecutar este estudio, Sin embargo, a pesar de las dificultades se logró nuestro objetivo de demostrar la efectividad antibacterial del extracto etanólico de la *Hibiscus sabdariffa L.* y así contribuir con la odontología con el uso alternativo de plantas para la prevención de la caries dental, beneficiando a los pobladores de nuestra región.

3.2. Conclusiones

- Si existe efecto antibacterial in vitro del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75% y 100% de concentración sobre el *Streptococcus mutans*.
- El extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 100% tiene mayor efecto antibacterial sobre el *Streptococcus mutans* demostrando ser sensible según la escala de Duraffourd a las 24 horas. A mayor concentración mayor efecto antibacterial.
- El extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 100% tiene mayor efecto antibacterial sobre el *Streptococcus mutans* demostrando ser sensible según la escala de Duraffourd a las 48 horas
- El extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 100% tiene mayor efecto antibacterial sobre el *Streptococcus mutans* a las 48 horas en comparación a las 24 horas demostrando que a mayor tiempo y concentración mayor es el efecto antibacterial.
- Si hay diferencia del efecto antibacterial del extracto etanólico de *Hibiscus sabdariffa L.* al 25%, 50%, 75%, y 100% sobre el *Streptococcus mutans* mediante halos con el control positivo y el control negativo a las 24 y 48 horas.
- Para lograr mayor eficacia de la *Hibiscus sabdariffa L.* sobre otros agentes patógenos se recomienda realizar más estudios experimentales in vitro de la planta. Habiendo obtenido resultados positivos en cuanto al extracto etanólico de la planta. se recomienda elaborar estudios comparativos entre los efectos del extracto etanólico, extracto acuoso y aceite esencial de la *Hibiscus sabdariffa L.* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* y otras

bacterias que habitan la cavidad oral. Se recomienda realizar un estudio exhaustivo de cada componente de la Hibiscus sabdariffa L. para determinar el componente exacto que tiene el efecto inhibitorio en el Streptococcus mutans. Del mismo modo se sugiere investigar las otras partes de la Hibiscus sabdariffa L. como el cáliz y las hojas para hacer un estudio más completo y no solo de los pétalos.

REFERENCIAS

1. Encarnación M, Esquivel K. Comparación del efecto antibacteriano entre soluciones de Hibiscus Sabdariffa y Clorhexidina 0.12% sobre el *Aggregatibacter Actinomycentemcomitans* (Estudio in vitro). Huánuco:2017-2018. Disponible en: https://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13080/3039/TO%2000088%20E56.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR2w6Glc5yRzysxnrFIbmO3xQ8AlCm_V8DHa_qiNNADs6NARHgtzk6lgT28
2. Ponce G, Espillco M. Efecto antiinflamatorio del gel a base del extracto hidroalcohólico de la flor de Hibiscus sabdariffa L. (flor de jamaica) en ratas albinas. Huancayo: 2019. Disponible en: <https://repositorio.uoosevelt.edu.pe/bitstream/handle/ROOSEVELT/342/TESI%20%282%29.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
3. Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. Univ Odontol. 2014; 33(71): 65-73. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/14228>
4. Larsen T, Fiehn N. Dental biofilm infections - an update. APMIS. 2017;125(4):376-384. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28407420/>
5. Scharnow A, Solinski A, Wuest W. Targeting *S. mutans* biofilms: a perspective on preventing dental caries. MedChemComm. 2019;10(7):1057-1067. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6644389/>
6. Riaz G, Chopra R. Biomedicine & pharmacotherapy a review on phytochemistry and therapeutic uses of hibiscus sabdariffa L. Biomed Pharmacother.2018;102:575-586. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0753332217323247>

7. Singh E, Srivastava S, Singh A. Pharmacological property of hibiscus sabdariffa a review. IJPT.2016;7(3):140-145. Disponible en: [http://www.ijptjournal.com/File_Folder/140-145\(ijptjournal\).pdf](http://www.ijptjournal.com/File_Folder/140-145(ijptjournal).pdf)
8. Kusumanegara K, Rachmawati E, Setiawan A. The difference of inhibitory zone between katuk (*Sauropus androgynous* L. Merr.) leaf infusion and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) petals towards oral candida albicans. Padjadjaran J Dent. 2017;29(2):118-122. Disponible en: <https://jurnal.unpad.ac.id/pjd/article/view/13647/6492>
9. Sri T. The difference of the salivary volume before and after drinking the rosella tea (*Hibiscus sabdariffa*). Padjadjaran J Dent. 2010;22(3):171–174. Disponible en: <https://jurnal.unpad.ac.id/pjd/article/view/26889/13156>
10. Baena S, Piloni J, Santos E, Gómez C, Rangel E, Castro J. Comparison of the Antimicrobial Activity of *Hibiscus sabdariffa* Calyx Extracts, Six Commercial Types of Mouthwashes, and Chlorhexidine on Oral Pathogenic Bacteria, and the Effect of *Hibiscus sabdariffa* Extracts and Chlorhexidine on Permeability of the Bacterial Membrane. J Med Food. 2021;24(1):67-76. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32326807/>
11. Machmud E. Effectiveness of Roselle Effervescent Tablets as Traditional Medicinal Plants in preventing Growth of Candida albicans Colonies and Streptococcus mutans. J Contemp Dent Pract. 2018;19(8):925-928. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30150490/>
12. Febriyanti I, Dewi I, Indriyani R, Christiono S. The effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) petals extract as alternative disclosing solution for dental plaque identification. Jurnal kedokteran gigi.2018;3(2) Disponible en: <https://ppjp.ulm.ac.id/journal/index.php/dentino/article/view/5384>.
13. Indriani L, Dharmautama M. Antimicrobial test of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) ethanol extract againts Porphyromonas gingivalis and Streptococcus sanguis using agar method (In vitro study). J Dentomaxillofac Sci.2016;2(1): 287-293, Disponible en: <https://jdmfs.org/index.php/jdmfs/article/view/12>

14. Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. *JMBFS*.2016;9(2):119-124. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764516000213?via%3Dihub>
15. Hassan S, Berchová K, Šudomová M. Antimicrobial, antiparasitic and anticancer properties of *Hibiscus sabdariffa* (L.) and its phytochemicals: in vitro and in vivo studies. *Ceska Slov Farm*. 2016;65(1):10-14. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27118499/>
16. Mohamed E. Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. *J Intercult Ethnopharmacol*.2016;5(2):186-190. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4835995/#:~:text=sabdariffa%20calyxes'%20revealed%20good%20antibacterial,antibacterial%20in%20foods%20%5B22%5D>.
17. Chandra B, Nagarajappa R, Suma S, Thakur R. Herbal extracts in oral health care - A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacogn Rev*. 2015;9(18):87-92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26392704/>
18. Riwandy A, Aspriyanto D, Budiarti L. Aktivitas ekstrak air kelopak bunga rosella (*Hibiscus 518 sabdariffa* L.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* in vitro. *Dentino Jur Ked Gigi*.2014;2(1):60-64. Diponible en: <https://jurnal.unpad.ac.id/jkg/article/view/18199/9090>
19. Chandrashekar B, Nagarajappa R, Singh R, Thakur R. An in vitro study on the anti-microbial effi cacy of ten herbal extracts on primary plaque colonizers. *J Young Pharm*.2014;6(4) Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/RupalSingh/publication/268747635_An_invitro_study_on_the_antimicrobial_efficacy_of_ten_herbal_ext_racts_on_primary_laque_colonizers/links/560baf3d08ae914928bd79c3/An-in-vitro-study-on-theanti-microbial-efficacy-of-ten-herbal-extracts-on-primary-plaque-colonizers.pdf

20. Naa Agowa P. Antimicrobial activity of Hibiscus sabdariffa against clinical isolates of bacteria. Acra-Ghana. 2014. Disponible en: <http://ugspace.ug.edu.gh/handle/123456789/7397>

21. Morales M, Hernandez J, Leiva G, Salinas Y, Soto L y Elencoro J. Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) calyxes. J. Med Plantas Res. 2013;7 (31): 2319-2322. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/255970877_Influence_of_variety_and_extraction_solvent_on_antibacterial_activity_of_roselle_Hibiscus_sabdariffa_L_calyxes

22. Maciel M, Pinto M, Chaves H, Wiest J. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (Hibiscus sabdariffa L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. Rev Inst Adolfo Lutz. 2012; 71(3):462-470. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/ses-sp/2012/ses-26940/ses-26940-3995.pdf>

23. Afolabi O, Ogunsola F, Coker A. Suceptibility of cariogenic Streptococcus mutans to extracts of Garcinia kola, Hibiscus sabdariffa and Solanum Americanum. West Afr J Med.2008;27(4):230-233. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19469401/>

24. Aragón B. Microorganismos y caries dental. Sevilla.2019. Disponible en: [https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/91655/ARAG%20M%20AR%20BEL%20N.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/91655/ARAG%c3%93N%20M%20AR%20BEL%20N.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

25. Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, et al. Biology of Oral Streptococci. Microbiol Spectr. 2018;6(5):1–12. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>

26. Clark T. Streptococcus mutans and dental caries. Br Med J. 1975;4:647. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1675671/pdf/brmedj014780053e.pdf>

27. Paizaraman J, Rios T. In vitro inhibitory effect of Stevia Rebaudiana ethanolic extract on the cariogenic virulence factors of Streptococcus mutans ATCC 25175. Agroind. Sci.2020;10(1):95-102. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/2864/3251>
28. Ojeda J, Oviedo E, Salas E. Streptococcus mutans y caries dental. Rev. CES Odont. 2013; 26(1):44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120971X2013000100005
29. Bowen W, Koo H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 2011;45(1):69-86. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21346355/>
30. Matsumoto-Nakano M. Role of Streptococcus mutans surface proteins for biofilm formation. Jpn Dent Sci Rev.2018;54(1):22–29. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1882761617300066?token=C1C30B33A47EA95EA7CF0A6C2FA508340B5EE670D48399196C0B9D63010F7C816C505638A3206202B12C1A62836EA574&originRegion=useast1&originCreation=20220111204107>
31. Basso ML. Conceptos actualizados en cariología. Rev Asoc Odontol Argent.2019;107:25-32. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-998725>
32. Guía de Práctica Clínica para la Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Caries Dental en Niñas y Niños.1era ed. Perú: MINSA;2017. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4195.pdf>.
33. Bustillos W, Bueno Z. Inibição do *Streptococcus mutans* isolado da cavidade oral de crianças sem cárie por substância antagônica produzida por *Lactobacillus* spp. Rev de Odontopediatria Latinoamericana.2020;10(1):13-23. Disponible en: <https://backup.revistaodontopediatria.org/ediciones/2020/1/art-2/>

34. Liebana J. Microbiología oral. 2 ed. Madrid: McGRAW-HILL Interamericana De España SA;2002. Disponible en: <https://unicieo.metabiblioteca.org/cgi-bin/koha/opacdetail.pl?biblionumber=1157>
35. Maske T, Van de Sande F, Arthur R, Huysmans M, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling*. 2017;33(8):661–675. Disponible en : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28792234/>
36. Shrivastava D, Natoli V, Srivastava K, Alzoubi A, Nagy A, Hamza O et al. Novel Approach to Dental Biofilm Management through Guided Biofilm Therapy (GBT). *A Review Microorganisms*. 2021;9(9):1966. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34576863/>
37. Xiaolan L, Hoogenkamp M, Ling J, Crielaard W, Deng DM. Diversity of *Streptococcus mutans* strains in bacterial interspecies interactions. *J Basic Microbiol*. 2013;54(2):97-113. Disponible en: <https://zh.booksc.eu/book/23048805/1d9a8c>
38. Izquierdo J, Arteaga D, Sánchez M, Morales J, Vargas N, Gómez C, et al. Organic acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)-A brief review of its pharmacological effects. *Biomedicines*. 2020;8(5):1–16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32354172/>
39. Guillén M. Efecto de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP) en la extracción de antocianinas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y evaluación de su potencial como colorante natural. Honduras. 2018. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6246/1/AGI-2018-To29.pdf>
40. Chafla M, Macías A. Estudio comparativo de la actividad antioxidante de la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) En Latinoamérica entre 2015-2020. Guayaquil-Ecuador 2021. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/53554>
41. Rosado K. Producción del cultivo flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.),

- Recinto Higuerón Santa. Guayas-Ecuador.2020. Disponible en: <https://cia.uagraria.edu.ec/Archivos/ROSADO%20CORAIZACA%20KERLY%20JANNETH.pdf>
42. Iza E. Beneficios de la Flor de Jamaica para la Salud Health Benefits of Jamaica Flower. 2020. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/350710127_Beneficios_de_la_Flor_de_Jamaica_para_la_Salud_Health_Benefits_of_Jamaica_Flower
43. Cid S, Guerrero J. Propiedades Funcionales De La Jamaica. TSIA UDLAP. 2012;2(2):47–63. Disponible en: <https://tsia.udlap.mx/propiedades-funcionales-de-la-jamaica-hibiscus-sabdariffa-1-2/>
44. Coello S, Garcia J. Desarrollo de una bebida refrescante a base de la flor de Jamaica (Hibiscus sabdariffa) níspero (Eriobotrya japonica) y evaluación de la actividad antioxidantes. Guayaquil.2021. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/54257>
45. [Nidhal Salem](#) , [Sarra Kefi](#) , [Olfa Tabben](#) , [Ameni Ayed](#) , [Slim Jallouli](#) , [Nedia Feres](#) ,et al. Variation in chemical composition of Eucalyptus globulus essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. Ind Crops Prod. 2018;124:115–25. Disponible en: <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/6112337>
46. Ojulari O, Lee S, Nam J. Beneficial Effects of Natural Bioactive Compounds from Hibiscus sabdariffa L. On obesity. Molecules. 2019;24(1):1–14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6337177/>
47. Silva E, Santana R, Silva N, Abreu L, Melo A, Sabino M, et al. Evidências do uso de fitoterápicos na odontologia: Uma revisão de literatura. Res Soc Dev. 2021;10(10). Disponible en: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/18167>
48. Pimentel E, Castillo D, Quintana M, Maurtua D, Villegas L, Díaz C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la

- tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. Rev Estomatológica Hered. 2016;25(4):268. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S101943552015000400004
49. Garcia F, Trauco M. Efecto del extracto de plantas medicinales sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Revista científica UNTRM.2020;3(3). Disponible en: <http://revistas.untrm.edu.pe/index.php/CNI/article/view/633/789>
50. Rojas J, Garcia M, Lopez A, Lopez A. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. BLACPMA.2005;(4)2:28. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85640204.pdf>
51. Prasetyoputri A, Rahmawati S, Atikana A, Izzati FN, Hapsari Y, Septiana E. A Mini Review on the Antibacterial Activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Phytochemicals. 2021. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/1192/1/012017/meta>
52. Herrera V. Conocimiento sobre el uso de la clorhexidina en restauraciones directas. Guayaquil.2019. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/40377/4/HERRERAVeronica.pdf>
53. Bustamante O, Paredes L, Perea A, Rojas K, Henckell C. Antisépticos orales: clorhexidina, flúor y triclosán. Rev Salud Vida Sipanense. 2020;7(1):4–16. Disponible en: <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/1280>
54. Ortiz N, Desinfección de cepillos dentales inoculados con *Streptococcus mutans* usando vinagre, Clorhexidina y cloruro de cetilpiridino. Quito.2017. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9426>
55. Diomedi A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao MI, Medel M, et al. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional.

- Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. Rev Chil infectología. 2017;34(2):156–174. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=So716-10182017000200010
56. Negroni M. Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires: Médica panamericana; 2009. Disponible en: https://www.academia.edu/32562740/Marta_Negroni_Microbiolog%C3%Aa_estomatol%C3%B3gica_fundamentos_y_gu%C3%ADa_pr%C3%A1ctica_M%C3%A9dica_Panamericana_2005359_
57. Maquera Y, Monroy S. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de Caléndula officinalis L. en Streptococcus mutans, Puno-2019. Puno. 2019. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/12142>
58. Gob Puno. Caracterización del Departamento de Puno. Disponible en: <https://www.bcrp.gob.pe/docs/Sucursales/Puno/puno-caracterizacion.pdf>
59. Hernandez R, Fernandez C, Baptista M. Metodología de la investigación. 6ta ed. Mexico: McGraw-Hill/Interamericana; 2014. Disponible en: <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>
60. Veiga J, Fuente E, Zimmermann M. Modelos de estudios en investigación aplicada: conceptos y criterios para el diseño. Med Segur Trab. 2008;54(210):81–88. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=So465-546X2008000100011
61. Cahuana L, Condori T. Efectividad Inhibitoria in vitro del extracto etanolico del Eucalyptus globulus sobre cepas de Streptococcus mutans y Candida albicans Puno. 2017. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/4181>
62. Medina R., Moreno L, Velasco M, Gutiérrez S. Estudio Comparativo de

- Medios de Cultivo para Crecimiento y Recuperación. *Nova*.2005;3(3), 25–30. Disponible en:https://www.researchgate.net/publication/316949211_Estudio_Comparativo_de_Medios_de_Cultivo_para_Crecimiento_y_Recuperacion_De_latcc_25175
63. Ramirez, L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Sci Tech*. 2009;(42):263-268. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
64. Condori K, Apaza M. efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico e infusión de Tiquil Tiquil (Aloysia triphylla) Vs Manzanilla (Matricaria chamomilla) sobre las cepas de prevotella intermedia Puno 2018. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/7139>
65. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2014; 94(3), 223–253. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160504001680>
66. Sáyago S, Goñi I. Hibiscus sabdariffa L: Fuente de fibra antioxidante. *Arch Latinoam Nutr*. 2010;60(1):79–84. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-06222010000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es.
67. Bermudez L, Gonzales M. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Villa clara*. 2016;20(3):167-175. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mdc/v20n3/mdc02316.pdf>

ANEXOS

Anexo 1: Fichas de recolección de datos

CONCENTRACIONES	MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN 24 HORAS				
	PLACAS REPETICIÓN	PLACA N°1	PLACA N°2	PLACA N°3	PLACA N°4
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 25%	REPETICIÓN N°1	9.6 mm	9.3 mm	9.1 mm	9.5 mm
	REPETICIÓN N°2	9.3 mm	9.3 mm	9.4 mm	9.3 mm
	REPETICIÓN N°3	9.4 mm	9.4 mm	9.4 mm	9.4 mm
	REPETICIÓN N°4	9.5 mm	9.4 mm	9.1 mm	9.5 mm
	REPETICIÓN N°5	9.5 mm	9.3 mm	9.3 mm	9.4 mm
	REPETICIÓN N°6	9.6 mm	9.2 mm	9.2 mm	9.3 mm
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 50%	REPETICIÓN N°1	10.1 mm	10.3 mm	10.5 mm	10.4 mm
	REPETICIÓN N°2	10.3 mm	10.4 mm	10.6 mm	10.5 mm
	REPETICIÓN N°3	10.2 mm	10.5 mm	10.4 mm	10.4 mm
	REPETICIÓN N°4	10.2 mm	10.4 mm	10.7 mm	10.7 mm
	REPETICIÓN N°5	10.3 mm	10.6 mm	10.3 mm	10.5 mm
	REPETICIÓN N°6	10.2 mm	10.5 mm	10.4 mm	10.6 mm
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 75%	REPETICIÓN N°1	12.4 mm	12.9 mm	12.9 mm	12.6 mm
	REPETICIÓN N°2	12.2 mm	12.8 mm	12.8 mm	12.4 mm
	REPETICIÓN N°3	12.1 mm	13 mm	12.7 mm	12.5 mm
	REPETICIÓN N°4	12.3 mm	13.1 mm	12.6 mm	12.3 mm
	REPETICIÓN N°5	12.2 mm	12.9 mm	12.9 mm	12.2 mm
	REPETICIÓN N°6	12.1 mm	12.8 mm	12.8 mm	12.7 mm
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 100%	REPETICIÓN N°1	13.5 mm	13.8 mm	13.9 mm	14.1 mm
	REPETICIÓN N°2	13.7 mm	13.9 mm	13.9 mm	14.2 mm
	REPETICIÓN N°3	13.6 mm	13.8 mm	13.7 mm	13.9 mm
	REPETICIÓN N°4	13.5 mm	13.8 mm	13.8 mm	13.8 mm
	REPETICIÓN N°5	13.4 mm	13.8 mm	13.7 mm	13.7 mm
	REPETICIÓN N°6	13.5 mm	13.8 mm	13.6 mm	14.1 mm
CLORHEXIDINA AL 0.12% (CONTROL POSITIVO)	REPETICIÓN 25%	17.9 mm	18.2 mm	17.8 mm	-
	REPETICIÓN 50%	17.7 mm	18.1 mm	18.1 mm	-
	REPETICIÓN 75%	17.8 mm	18.3 mm	17.8 mm	-
	REPETICIÓN 100%	17.9 mm	18.2 mm	17.5 mm	-
AGUA DESTILADA (CONTROL NEGATIVO)	REPETICIÓN 25%	-	-	-	0 mm
	REPETICIÓN 50%	-	-	-	0 mm
	REPETICIÓN 75%	-	-	-	0 mm
	REPETICIÓN 100%	-	-	-	0 mm

CONCENTRACIONES	MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN 48 HORAS				
	PLACAS REPETICIÓN	PLACA N°1	PLACA N°2	PLACA N°3	PLACA N°4
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 25%	REPETICIÓN N°1	9.9 mm	9.6 mm	9.5 mm	9.8 mm
	REPETICIÓN N°2	10.1 mm	9.7 mm	9.6 mm	9.7 mm
	REPETICIÓN N°3	9.7 mm	9.8 mm	9.7 mm	9.9 mm
	REPETICIÓN N°4	9.8 mm	9.4 mm	9.5 mm	9.7 mm
	REPETICIÓN N°5	10 mm	9.6 mm	9.6 mm	9.8 mm
	REPETICIÓN N°6	10.1 mm	9.5 mm	9.6 mm	9.6 mm
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 50%	REPETICIÓN N°1	10.5 mm	10.7 mm	10.9 mm	10.9 mm
	REPETICIÓN N°2	10.7 mm	10.8 mm	10.9 mm	10.8 mm
	REPETICIÓN N°3	10.6 mm	10.9 mm	10.7 mm	10.8 mm
	REPETICIÓN N°4	10.5 mm	10.7 mm	10.9 mm	10.9 mm
	REPETICIÓN N°5	10.6 mm	10.9 mm	10.7 mm	10.7 mm
	REPETICIÓN N°6	10.7 mm	10.8 mm	10.8 mm	10.9 mm
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 75%	REPETICIÓN N°1	13.5 mm	13.7 mm	13.4 mm	13.1 mm
	REPETICIÓN N°2	13.1 mm	13.4 mm	13.5 mm	13 mm
	REPETICIÓN N°3	13.2 mm	13.6 mm	13.2 mm	13.1 mm
	REPETICIÓN N°4	13.6 mm	13.8 mm	13.1 mm	12.8 mm
	REPETICIÓN N°5	13.4 mm	13.5 mm	13.5 mm	12.9 mm
	REPETICIÓN N°6	13 mm	13.3 mm	13.3 mm	13.2 mm
<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i> AL 100%	REPETICIÓN N°1	13.9 mm	14.2 mm	14.4 mm	14.5 mm
	REPETICIÓN N°2	14.2 mm	14.3 mm	14.5 mm	14.6 mm
	REPETICIÓN N°3	14 mm	14.2 mm	14.2 mm	14.3 mm
	REPETICIÓN N°4	14.1 mm	14.4 mm	14.3 mm	14.2 mm
	REPETICIÓN N°5	13.9 mm	14.3 mm	14.2 mm	14.1 mm
	REPETICIÓN N°6	13.9 mm	14.2 mm	14 mm	14.6 mm
CLORHEXIDINA AL 0.12% (CONTROL POSITIVO)	REPETICIÓN 25%	18.2 mm	18.2 mm	18.2 mm	-
	REPETICIÓN 50%	18.3 mm	18.3 mm	18.3 mm	-
	REPETICIÓN 75%	18.1 mm	18.1 mm	18.1 mm	-
	REPETICIÓN 100%	18.2 mm	18.2 mm	18.2 mm	-
AGUA DESTILADA (CONTROL NEGATIVO)	REPETICIÓN 25%	-	-	-	0 mm
	REPETICIÓN 50%	-	-	-	0 mm
	REPETICIÓN 75%	-	-	-	0 mm
	REPETICIÓN 100%	-	-	-	0 mm

Anexo 2: Fotografías



FACULTAD DE INGENIERIA
QUÍMICA



LABORATORIO DE OPERACIONES Y
PROCESOS UNITARIOS



PESADO DE *Hibiscus sabdariffa* L.



SELECCIÓN DE *Hibiscus Sabdariffa* L.



SEPARACIÓN DE IMPUREZAS



HORNO DE DESECACIÓN



COLOCACIÓN DE *Hibiscus Sabdariffa* L. EN HORNO DE DESECACIÓN



COLOCACIÓN DE *Hibiscus Sabdariffa* L. DESECADA EN CAJA DE ANAEROBIOSIS



LABORATORIO DE CONTROL DE CALIDAD FIQ



TRITURADO DE *Hibiscus sabdariffa* L.



Hibiscus Sabdariffa L. TRITURADA



BALANZA ANALITICA



PESADO EN BALANZA ANALITICA DE *Hibiscus sabdariffa* L. TRITURADO



SE UTILIZO POMO AMBAR, EMBUDO DE VIDRIO, PROBETA DE VIDRIO Y ALCOHOL AL 96%



COLOCACIÓN DE EMBUDO EN POMO AMBAR



COLOCACIÓN DE *Hibiscus sabdariffa* L. TRITURADA EN POMO AMBAR



MEDICION DE 450ML DE ALCOHOL AL 96% EN PROBETA DE VIDRIO



SE AÑADIO ALCOHOL MEDIANTE EMBUDO DE VIDRIO



TAPADO HERMETICO PARA
MACERACIÓN



MACERACIÓN DURANTE 15 DIAS



COLOCACIÓN DE EMBUDO DE
PAPEL FILTRO



COLOCACIÓN PARA FILTRADO



FILTRADO DE EXTRACTO



EXTRACTO ETANOLICO FILTRADO



CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO ETANOLICO 25 ml en PROBETA DE 100ml



SE COMPLETO CON 75 ml DE ALCOHOL AL 100% EN PROBETA DE 100 ml



ALMACENAMIENTO DE EXTRACTO ETANOLICO AL



EXTRACTO ETANOLICO EN DIFERENTES CONCENTRACIONES



SALA DE ESPERA



AMBIENTE PARA TOMA DE MUESTRA



CUMPLIMIENTO DE PROTOCOLO DE ATENCIÓN – TOMA DE TEMPERATURA



CUMPLIMIENTO DE PROTOCOLO DE ATENCIÓN – USO DE ALCOHOL



CONSENTIMIENTO INFORMADO



CUMPLIMIENTO DE PROTOCOLO DE ATENCIÓN – USO DE ENJUAGUE BUCAL



IDENTIFICACIÓN DE LA PIEZA PARA LA TOMA DE MUESTRA



TOMA DE LA MUESTRA



APERTURA DE TUBO DE ENSAYO
ESTERIL



CARGADO DE SUERO
FISIOLÓGICO



COLOCACIÓN DE SUERO
FISIOLÓGICO EN TUBO DE
ENSAYO ESTERIL



COLOCACIÓN DE LA MUESTRA
CON HISOPO ESTERIL



AGITACIÓN DEL HISOPO EN
SUERO FISIOLÓGICO



SELLADO DE LA MUESTRA



ROTULADO DE LA MUESTRA



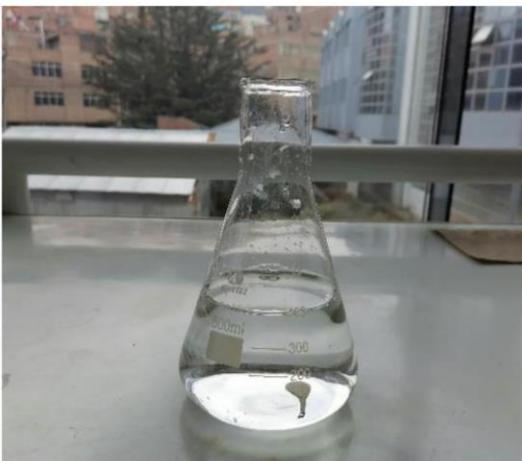
COLOCACIÓN DE MUESTRA PARA TRASLADO



RETIRADO DE INSTRUMENTAL ESTERIL



PESADO DE CALDO NUTRITIVO



COLOCACIÓN DE AGUA ESTERIL EN MATRAZ



SE CALIENTA PARA SU CORRETA DISOLUCIÓN



COLOCACIÓN DE MATRAZ EN
AUTOCLAVE



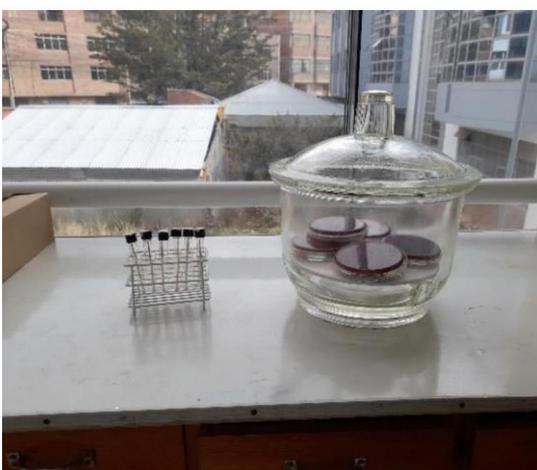
CERRADO DE AUTOCLAVE



PLAQUEADO



SEMBRADO DE LA MUESTRA



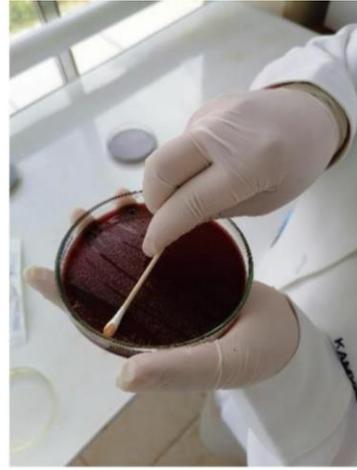
COLOCACIÓN PLACAS EN CAJA DE
ANAEROBIOSIS



INCUBACIÓN EN ANAEROBIOSIS
POR 24 HORAS



COLOCACIÓN DE PLACAS EN AEROBIOSIS POR 24 HORAS



SELECCIÓN DE COLONIA PARA INOCULAR A TUBO DE ENSAYO



COLOCACIÓN DE BACTERIA EN TUBOS DE ENSAYO



COLOCACIÓN DE TUBOS DE ENSAYO EN INCUBADORA POR 24 HORAS



TUBOS DE ENSAYO DESPUES DE 24 HORAS EN INCUBADORA



REACTIVOS PARA LA TINCIÓN



COLOCACIÓN DE LA MUESTRA EN PORTAOBJETOS



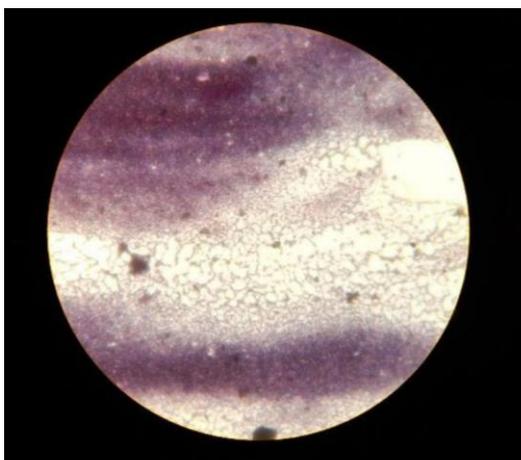
EXPANSIÓN DE LA MUESTRA



COLOCACIÓN DE REACTIVO



ENJUAGAR



VISTA HISTOLOGICA



PESADO DE MITIS SALIVARIUS PARA REPLICACIÓN DE LAS BACTERIAS



PREPARADO DE MITIIS
SALIVARIUS



PLAQUEADO



INCUBACIÓN EN ANAEROBIOSIS
POR 24 HORAS



PLACAS DESPUES DE 24 HORAS EN
ANAEROBIOSIS



RECOLECCIÓN PARA REPLICA
FINAL



PESADO DE AGAR



CALENTAR PARA DILUIR



COLOCACIÓN EN AUTOCLAVE



MATERIAL ESTERIL



PLAQUEADO FINAL



SACABOCADOS



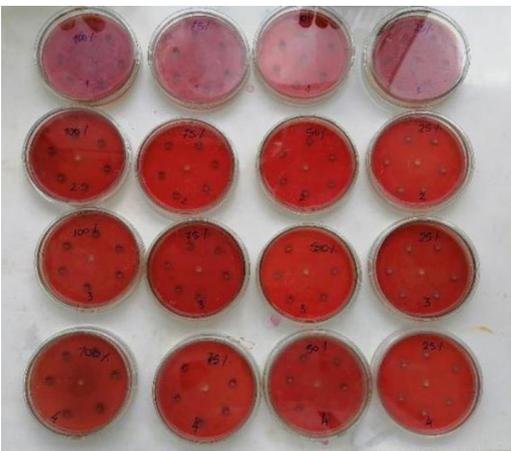
COLOCACIÓN DE PAPEL FILTRO



PLACA LISTA PARA SER
INOCULADA CON EL EXTRACTO
ETANOLICO



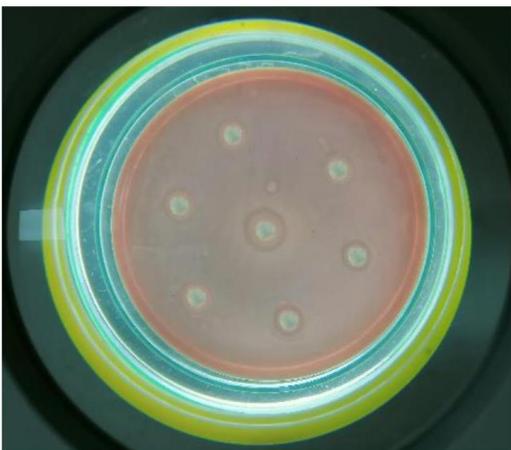
PIPETA DIGITAL



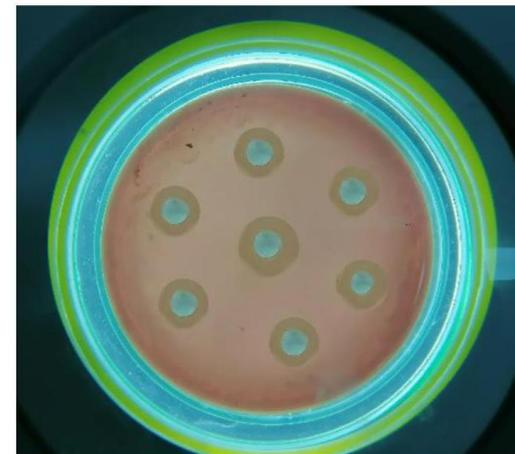
PLACAS INOCULADAS CON
EXTRACTO Y ROTULADAS



INCUBACIÓN EN ANAEROBIOSIS



EXTRACTO ETANÓLICO DE
Hibiscus Sabdariffa L. AL 25%



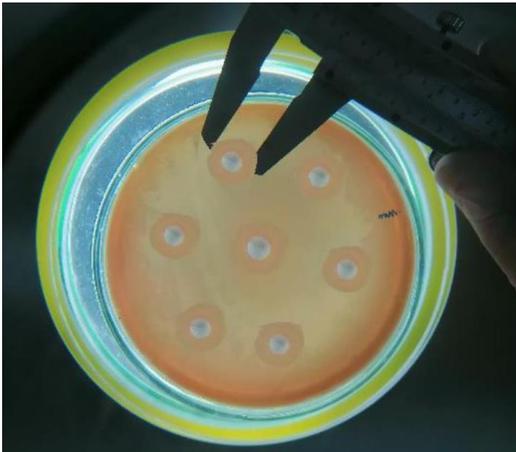
EXTRACTO ETANÓLICO DE
Hibiscus Sabdariffa L. AL 50%



EXTRACTO ETANÓLICO DE
Hibiscus Sabdariffa L. AL 75%



EXTRACTO ETANÓLICO DE
Hibiscus Sabdariffa L. AL 100%



MEDICIÓN DE LOS HALOS



ISBN: 978-612-5069-02-3



EDITADA POR
INSTITUTO
UNIVERSITARIO
DE INNOVACIÓN CIENCIA
Y TECNOLOGÍA INUDI PERÚ