



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO  
HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Origanum  
vulgare L.* (orégano) SOBRE *Streptococcus mutans*  
ATCC 25175**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**AUTORES:**

**Bach. MARTINEZ CAJAHUANCA, ROSARIO BEATRIZ**

<https://orcid.org/0000-0002-9882-7043>

**Bach. CORDOVA ZORRILLA, EDUARDO FRANCO**

<https://orcid.org/0000-0002-5701-6535>

**ASESOR:**

**Dr. VILCHEZ CACEDA, HECTOR ALEXANDER**

<https://orcid.org/0000-0001-7094-0821>

**LIMA – PERÚ**

**2022**

## **DEDICATORIA**

A Dios por darme la vida, salud y sabiduría. A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad y por el apoyo constante a lo largo de mi etapa universitaria.

Martínez Cajahuanca Rosario Beatriz

A mis padres Norma y Eduardo quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí, el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

Córdova Zorrilla Eduardo Franco

## **AGRADECIMIENTO**

Nuestra gratitud a la Escuela de Ciencias Farmacéuticas de la universidad María Auxiliadora, a cada docente quienes con su apoyo y enseñanzas formaron las bases de nuestra vida profesional.

A nuestro asesor de tesis el Dr. Vílchez Cáceda, Héctor Alexander por habernos brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento para guiarnos durante todo el desarrollo de la tesis.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Páginas</b>
<b>Resumen</b>	<b>viii</b>
<b>Abstract</b>	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>7</b>
2.1. Enfoque y diseño de la investigación	<b>7</b>
2.2. Población, muestra y muestreo	<b>7</b>
2.3. Variables de investigación	<b>8</b>
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	<b>9</b>
2.5. Proceso de recolección de datos	<b>9</b>
2.6. Métodos de análisis estadístico	<b>10</b>
2.7. Aspectos éticos	<b>10</b>
<b>III. RESULTADOS</b>	<b>11</b>
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	<b>17</b>
4.1. Discusión de resultados	<b>17</b>
4.2. Conclusiones	<b>19</b>
4.3. Recomendaciones	<b>20</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>21</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>26</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
Tabla 1. Resultados del ensayo de solubilidad	<b>11</b>
Tabla 2. Tamizaje fitoquímico	<b>12</b>
Tabla 3. Halos de inhibición de ensayo microbiológico en <i>Streptococcus mutans</i> .	<b>13</b>
Tabla 4. Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico.	<b>14</b>
Tabla 5. Comparación de medias por el ANOVA	<b>14</b>
Tabla 6. Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey	<b>16</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Selección de la muestra de <i>Origanum vulgare L.</i>	<b>38</b>
<b>Figura 2.</b>	Procedimiento de lavado de la muestra de <i>Origanum vulgare L.</i>	<b>38</b>
<b>Figura 3.</b>	Procedimiento de secado de la muestra de <i>Origanum vulgare L.</i>	<b>39</b>
<b>Figura 4.</b>	Procedimiento de molienda de la muestra de <i>Origanum vulgare L.</i>	<b>39</b>
<b>Figura 5.</b>	Preparación del macerado del extracto etanoico de <i>Origanum vulgare L.</i>	<b>40</b>
<b>Figura 6.</b>	Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico de <i>Origanum vulgare L.</i>	<b>40</b>
<b>Figura 7.</b>	Obtención del extracto seco de <i>Origanum vulgare L.</i>	<b>41</b>
<b>Figura 8.</b>	Preparación de Medio de Cultivo	<b>41</b>
<b>Figura 9.</b>	Activación de la cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<b>42</b>
<b>Figura 10.</b>	Inoculación de placas	<b>42</b>
<b>Figura 11.</b>	Preparación de discos de sensibilidad	<b>43</b>
<b>Figura 12.</b>	Colocación del disco	<b>43</b>
<b>Figura 13.</b>	Incubación	<b>44</b>
<b>Figura 14.</b>	Lectura de resultados	<b>44</b>

## Índice de Anexos

ANEXO A. Instrumento de recolección de datos	<b>26</b>
ANEXO B. Matriz de consistencia	<b>28</b>
ANEXO C. Operacionalización de variables	<b>29</b>
ANEXO D. Certificado taxonómico	<b>30</b>
ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio	<b>31</b>
ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton	<b>32</b>
ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa <i>Streptococcus mutans</i>	<b>36</b>
ANEXO H. Evidencias fotográficas	<b>38</b>

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar el efecto antibacteriano in vitro, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Materiales y métodos:** Investigación de tipo experimental, explicativo, prospectivo, transversal, población de 10 kilos de hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) y cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, por otro lado, la muestra estuvo constituida por 2 kilos de hojas secas y la muestra biológica usada consistió de 10 placas Petri. El procedimiento fitoquímico fue la marcha fitoquímica mediante reacciones de coloración y precipitación y el método microbiológico usado fue el de difusión en agar o Kirby-Bauer el cual requirió del uso de 10 repeticiones y estuvo constituida por los grupos experimentales al 5 %, 25 %, 50 % y 90 %, el grupo control fue Amoxicilina 25 µg y Dimetilsulfoxido (DMSO).

**Resultados:** Los metabolitos secundarios que se detectaron en la prueba del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) fueron los compuestos fenólicos, antocianinas, terpenos y esteroides, alcaloides y lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas. Por otro lado, mediante la prueba de ANOVA ( $p < 0,05$ ) y Tukey, se demostró como resultado una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales al 25 %, 50 % y 90 % comparado con el control (DMSO) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Conclusión:** El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Palabras clave:** *Origanum vulgare L.*; antibacteriano; extracto hidroalcohólico

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the antibacterial effect in vitro of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Origanum, vulgare, L.* (Oregano) on *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Materials and methods:** Experimental, explanatory, prospective, cross-sectional research, population of 10 kilos of Leaves of *Origanum vulgare* (oregano) and strain of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, on the other hand, the sample consisted of 2 kg of dried leaves and the biological sample used were 10 Petri dishes. The phytochemical procedure was the phytochemical march through coloration and precipitation reactions and the microbiological method used was that of diffusion in agar or Kirby-Bauer which required the use of 10 repetitions and was constituted of the experimental groups at 5%, 25%, 50% and 90%, control group Amoxicillin 25 µg and Dimethylsulfoxide (DMSO).

**Results:** The secondary metabolites that were detected in the phytochemical screening test of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Origanum vulgare L.* (Oregano) were the phenolic compounds, anthocyanins; terpenes and steroids, alkaloids and lactones  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated. On the other hand, by means of the ANOVA test ( $p < 0.05$ ) and Tukey, a statistically significant difference between the experimental groups was demonstrated at 25%, 50% and 90% compared to the control (DMSO) compared to *Streptococcus mutans* ATCC 25175

**Conclusion:** The hydroalcoholic extract of the leaves of *Origanum vulgare L.* (Oregano) has antibacterial activity against strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Keywords:** *Origanum vulgare L.*; antibacterial; hydroalcoholic extract

## I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad bacteriana más común en los seres humanos son las caries dentales<sup>1-3</sup>; siendo el *Streptococcus mutans*, el principal microorganismo relacionado con dicha patología, visto como la especie más común en la placa dentobacteriana<sup>4-6</sup> llegando a ser una de las principales enfermedades según la Organización mundial de la salud (OMS) a nivel mundial, afectando cerca del 90 % de la población<sup>7-8</sup>.

Un estudio en China analizó la prevalencia y las causas que afectan a la caries dental en los menores de edad preescolar, descubriendo que la tasa prevalente de caries de un total de 2250 niños entre 3 a 5 años representando un 58,71 %, el 3,46 % se consideraron clínicamente graves<sup>9-11</sup>.

En África, se registró que la frecuencia de caries incrementó exponencialmente del 17,2 al 88,8 %, en la primera infancia del 3 % al 57 % presentando un alto índice de recurrencia a las clínicas por riesgo de infección de caries<sup>12-14</sup>.

En Europa, en Reino Unido, en un hospital público especializado en salud dental, se registraron datos de adolescentes de 12 y 15 años que presentaron una tasa de (1,54 IC del 95 %: 1,30 – 1.77)<sup>6</sup>, por el contrario, los niños italianos, evidenciaron 2 y 2,5 veces mayor índice de infección por caries acudiendo con mayor frecuencia a clínicas públicas<sup>15-16</sup>.

Por otro lado, en Estados Unidos aproximadamente el 23 % de los niños entre 2 a 5 años experimentaron los efectos nocivos de la caries dental<sup>8</sup>. Asimismo, el 10 % de los niños tenían caries dentales no tratadas, evidenciando la existencia del dolor dental, agujeros en los dientes y sangrado repentino al momento de ingerir algún alimento<sup>17-19</sup>.

De igual importancia, el predominio en el continente Latinoamericano oscila entre el 60 % y el 90 % de la población entre 5 y 17 años<sup>19</sup>. Tal como lo señala la Organización panamericana de la salud (OPS)<sup>20-22</sup>.

Una consecuencia importante de las caries dentales corresponde a la extensión en otras capas de los dientes, causando contaminaciones, problemas para masticar y pérdida dental, debido a abscesos dentales<sup>23-25</sup>.

En México, el ritmo de los dientes cariados, extraídos y obstruidos en los niños de 2 a 4 años están con una proporción a incrementarse con la edad, los niños preadolescentes evidenciaron un incremento del índice de dientes cariados<sup>26</sup>. Este comportamiento se refleja también en Chile, en el año 2019, se reportó un registro en niños menores de 2 años y que posteriormente incrementó considerablemente en niños de 4 años<sup>27-28</sup>.

De igual importancia en el Perú, el (MINSA) demostró que los peruanos con un total de 90,4 % carecen de caries dental y un 85 % posee infección periodontal, demostrando que la inadecuada propensión a la limpieza bucal es la premisa central de estos padecimientos en general<sup>29-30</sup>. Asimismo, en el plano nacional en un hospital de Lambayeque se observó el predominio de la caries dental en menores en el rango de los 6 y 7 años, indicando que el 23,64 % de menores padecían esta afección y que no acudían con regularidad a clínicas públicas para tratar la caries dental<sup>31</sup>. Por otro lado, en Lima, en un instituto médico se determinó el grado de limpieza bucal en niños de 1 a 4 años, indicando que solo el 36,8 % de los pacientes evidenciaron un nivel de prevalencia bajo con respecto a las caries dentales, sin embargo, el 63,2 % manifestó que la mala higiene bucal predominó con un valor por encima del 50 %<sup>32</sup>. Por lo tanto, es de vital importancia realizar investigaciones con productos naturales que sean alternativas terapéuticas frente a esta infección que es de carácter mundial.

El recurso vegetal en investigación es el orégano, el cual es originario del Mediterráneo de Europa, así mismo del sur y centro de Asia, desarrollado en las zonas altoandinas de Perú; las *Verbenaceae*, *Lamiaceae* y *Asteraceae* son las familias más representativas por su importancia económica<sup>33</sup>. Algunas de las particularidades naturales del orégano son: antimicrobiano, antioxidante antígenotóxico, estrogénico<sup>34</sup>. Con la ayuda de los concentrados fluidos y los aceites fundamentales, algunas investigaciones han distinguido las partes de *Origanum Vulgare L.*, estas mezclas son: Ácido ferúlico, vainillínico, rosmarínico,

terpineno carvacrol, o-cumárico, r-cimenotimol, r-hidroxibenzoico, cafeico,  $\beta$ -cariofileno, g-terpineno, Mirceno<sup>35</sup>.

*Streptococcus mutans*: Es una bacteria Gram positiva, destructiva y cambia el pH salival de 7 a 4.2 en 24 horas, es visto como un fermentador de la glucosa<sup>36</sup>. Esta bacteria ha sido subclasificada en varios tipos según sus propiedades inmunológicas, orgánicas y hereditarias<sup>37</sup>. *Streptococcus mutans*, presenta los serotipos c, e, f y k; viven en el orificio bucal humano y se adhieren a la superficie dental sólida y a las lesiones cariosas<sup>38</sup>.

Badekova Z, et al (2021), evaluó la actividad antibacteriana en la formulación de gel en base a *Origanum Vulgare* en Asia. Obteniendo como resultado que el aceite esencial del orégano reprimió el desarrollo de *Streptococcus mutans* en un 98 %. Concluyendo que el gel que elaboraron puede estimarse como un gel anticaries por su alta actividad antimicrobiana<sup>39</sup>.

Ulusoy N, et al (2019), evaluaron el movimiento antibacteriano de los dentífricos caseros en base de las hierbas contra *Streptococcus mutans*. Hallando como resultados que luego de añadir el aceite esencial de *Origanum dubium*, las pastas dentales evidenciaron efecto antibacteriano. Concluyendo que las pastas dentales en base a dicha especie botánica indican un efecto antibacteriano considerablemente más alto frente a *Streptococcus mutans*<sup>40</sup>.

Schovelin A, et al (2018), analizaron el impacto antibacterial del *Origanum vulgare* en varias fijaciones sobre el desarrollo in vitro de *Streptococcus mutans*. Los resultados encontrados fueron negativos para las mezclas de orégano en 1 %, 5 %, y 10 % ya que no mostraban ninguna zona de inhibición bacteriana; así, los resultados fueron positivos para las infusiones al 20 %, 40 %, 60 %, 80 % y 100 %. Se concluye que el orégano obtiene un efecto antibacteriano del desarrollo de *Streptococcus mutans* en concentraciones de infusión superiores al 20 %, podría usarse como enjuague bucal alternativo, pasta de dientes o demás adyuvantes de la limpieza bucal para prevenir la frecuencia de las caries<sup>41</sup>.

Vilca J, (2019), determinó el impacto antibacteriano del aceite esencial in vitro del orégano de Otuzco de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Los resultados señalaron que el aceite al 10 % y 25 % de concentración, indicaron un índice de

inhibición estándar de 12,15 mm y 16,38 mm respectivamente, a diferencia del 50 % que expresó 20,00 mm. Concluyendo que el aceite esencial del orégano con un 50 % dispone de un impacto antibacteriano in vitro más prominente del *Streptococcus mutans* a diferencia de las otras concentraciones del 10 % y 25 %<sup>42</sup>.

Vázquez J, (2019), evaluó el desarrollo antibacteriano in vitro del concentrado fluido del orégano de acuerdo a los *Streptococcus mutans* en tres únicas concentraciones (10 %, 50%, 100%). Hallando como resultado que el extracto líquido de *Origanum Vulgare L* en 10% y 50 % y 100 % evidenció una limitación de inhibición estándar de 6,18, 7,81 y 8,63 mm respectivamente. Concluyendo que las concentraciones empleadas, muestran actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*<sup>43</sup>.

Albines W, (2020), identificó el impacto antibacteriano del *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” in vitro y “orégano” contra el *Streptococcus Mutans* ATCC 25175. Hallando como resultado que *Syzygium aromaticum* evidenció un índice de inhibición estándar de 20.09 mm  $\pm$  1.87 mm, a diferencia del *Origanum vulgare* que obtuvo el halo de inhibición promedio de 14,74 mm  $\pm$  0,41 mm. Concluyendo que *Syzygium aromaticum* predominó con un índice promedio en desemejanza del *Origanum vulgare* quien obtuvo un menor promedio<sup>44</sup>.

El presente estudio se justifica en el aspecto teórico, ya que aporta información actualizada sobre el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175<sup>45</sup>.

En el ámbito práctico los resultados de este estudio servirán para que en un futuro se puedan elaborar fármacos naturales, que contengan compuestos químicos propios de esta planta para mitigar esta infección que afecta a nivel de la salud pública<sup>46</sup>.

El objetivo general de la investigación será determinar el efecto antibacteriano in vitro, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

La hipótesis general de la investigación fue:

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) presenta efecto antibacteriano in vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Enfoque y diseño de la investigación

**Enfoque:** Cuantitativa ya que los resultados se mostraron en datos numéricos<sup>47</sup>.

**Experimental:** Debido a que se manipuló la variable independiente para tener un resultado sobre la variable dependiente<sup>48</sup>.

**Explicativo:** Se determinó y especificó las relaciones existentes entre las diferentes variables que influyen en un fenómeno<sup>49</sup>.

**Prospectivo:** En el presente estudio se recolectaron datos del presente hacia adelante<sup>49</sup>.

**Transversal:** Puesto que la información se recolectó en un momento y tiempo determinado de la investigación<sup>49</sup>.

### II.2. Población, muestra y muestreo

#### Población:

- **Vegetal:** Se consideró 10 kilos de hojas de *Origanum vulgare* (orégano), procedente de la región de Candarave en el departamento de Tacna, altura de 3415 m.s.n.m. y coordenadas de 17°16'15"S 70°15'06"O.
- **Biológica:** Corresponde a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, la procedencia es de laboratorios Microbiologics ATCC, 200 Cooper Ave N, St Cloud, MN 56303, Estados Unidos.

#### Muestra:

- **Vegetal:** Constituida por 2 kg de hojas secas de *Origanum vulgare* L. (orégano).
- **Biológica:** Se consideraron a 10 placas Petri con medio de cultivo y cepa.

### **Criterios de inclusión:**

- Hojas que tengan buen aspecto y sin lesiones.

### **Criterios exclusión:**

- Hojas en mal estado, rotas y con aspectos de deterioro.

**Muestreo:** El muestreo fue no probabilístico, debido a que la muestra no fue al azar y se consideró criterios de inclusión y exclusión por parte de los investigadores.

### **II.3. Variables de investigación**

**Variable independiente:** Extracto hidroalcohólico de hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano).

Definición conceptual: Mezcla compleja compuesta por metabolitos primarios y secundarios extraídos con etanol.

Definición operacional: Se realizó la prueba de solubilidad con solventes de diferente polaridad y el análisis fitoquímico respectivo.

**Variable dependiente:** Efecto antibacteriano in vitro sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Definición conceptual: Aplicación terapéutica que posee una determinada sustancia para causar lisis o detener el crecimiento de un agente bacteriano.

Definición operacional: La cepa de *Streptococcus mutans*, se procedió a sembrar en placas Petri, junto con discos controles y experimentales a diversas concentraciones (5 %, 25 %, 50% y 90 %) para luego realizar la medición de diámetro inhibición (mm).

### **II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos**

La técnica usada fue la observación y aplicación de procedimientos analíticos de tipo fitoquímico y microbiológico denominado como método de difusión en agar en disco o Kirby Bauer, en función a medición de halos de inhibición y catalogada según la escala de Duraffourd.

El instrumento fue la ficha de observación de elaboración propia para el registro del análisis microbiológico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano).

## **II.5. Plan metodológico para la recolección de datos**

Estuvo basado en el tipo de observación no participativa.

La recolección de las hojas de orégano se realizó mediante técnica manual, utilizando los criterios de inclusión y exclusión, luego se guardaron en soportes de cartón o madera para el transporte a la ciudad de Lima, posteriormente al laboratorio de análisis biológico y microbiológico Santa Rosa, asimismo se llevó para la identificación taxonómica correspondiente de la especie vegetal.

En las instalaciones del laboratorio de análisis biológico y microbiológico Santa Rosa, las hojas se seleccionaron y luego pasaron por un proceso de desinfección con hipoclorito de sodio 10 ppm durante 10 minutos, después se secó a temperatura ambiente, y fue llevada a estufa a temperatura de 40 °C para la deshidratación<sup>50</sup>.

Posteriormente, las hojas se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo homogéneo, que fue llevado a un frasco ámbar de vidrio para la maceración, utilizando etanol a 70 %, dicho proceso tuvo una duración de 5 días, después de la maceración, el extracto fluido fue filtrado para luego ser llevado nuevamente a la estufa a 40 °C para la obtención del extracto seco.

Por otro lado, en el ensayo de solubilidad se agregó 0,5 g del extracto seco y 0,5 mL de solventes de naturaleza apolar y polar en el siguiente orden: Metanol, diclorometano, butanol, etanol, agua destilada, cloroformo y éter de petróleo.

El estudio fitoquímico consistió en una reacción de coloración y precipitación según el método descrito por Lock (2016). Para esta prueba se utilizaron los siguientes reactivos: Borntrager, para hallar quinonas; tricloruro de hierro, para compuestos fenólicos; Shinoda, para flavonoides; Hidróxido de sodio al 10 %, para antocianinas; gelatina sal, para taninos; Dragendorff, Wagner y Mayer, para alcaloides; Baljet, para Lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturadas, Liebermann - Burchard, para terpenos y esteroides; y prueba de espuma para saponinas<sup>51</sup>

La cepa que se utilizó fue *Streptococcus Mutans* ATCC 25175. La reacción de la cepa fue mediante el uso del pellet que contiene la cepa liofilizada, el cual fue disuelto con el líquido que proporcionó el fabricante, al instante de esta acción se utilizó un hisopo estéril para embeberlo en la solución y homogenizarlo en Agar sangre, finalmente se llevó a la incubadora a 37 °C por 24 horas.

- Sembrado de las Placas: La inoculación de la cepa, se llevó a cabo en agar Mueller Hinton enriquecido con sangre para *Streptococcus mutans*, sumergiendo un asa de siembra sobre el caldo que contuvo las cepas bacterianas para luego inocular las placas en los medios de cultivo ya mencionados.
- Preparación de los discos: Los discos se prepararon con una hoja filtrada llamada Whatman N°1. En cada placa Petri inoculada, se puso los posteriores discos de difusión:
  - Grupo experimental 1: Extracto de *Origanum vulgare* L. (orégano) 5 %
  - Grupo experimental 2: Extracto de *Origanum vulgare* L. (orégano) 25 %
  - Grupo experimental 3: Extracto de *Origanum vulgare* L. (orégano) 50 %
  - Grupo experimental 4: Extracto de *Origanum vulgare* L. (orégano) 90 %
  - Grupo control: Amoxicilina 25 µg
  - Grupo control: Dimetilsulfóxido (DMSO)

Posteriormente se procedió a incubar todas las placas, en la incubadora a 37 °C de 24 a 48 horas, y después se midió los halos de inhibición utilizando el vernier digital.

Cada diámetro obtenido de los halos de inhibición fue clasificado según la escala de Duraffourd, la cual es utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro<sup>52</sup>.

- Sensibilidad nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad (+): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Muy sensible (++) : para un diámetro entre 14 y 20 mm.
- Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.

## **II.6. Procesamiento del análisis estadístico**

La recolección de información se llevó a cabo en una ficha de observación y luego analizado en un paquete estadístico de tipo SPSS versión 27, asimismo se aplicó estadística descriptiva como medidas de tendencia central, como también estadígrafos inferenciales como ANOVA y el test de Tukey<sup>53</sup>.

## **II.7. Aspectos éticos**

Se consideró los siguientes principios bioéticos: autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia, asimismo con los aspectos éticos de originalidad de información e investigación<sup>54</sup>.

### III. RESULTADOS

Los análisis que se realizaron en la investigación para evaluar el efecto antibacteriano in vitro, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum, vulgare, L.* (orégano) sobre *Streptococcus, mutans* ATCC 25175, fueron:

#### III1. Prueba de solubilidad

**Tabla 1.** Ensayo de solubilidad

TUBO	SOLVENTE	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	-
N° 2	Diclorometano	-
N° 3	Cloroformo	-
N° 4	Butanol	-
N° 5	Etanol 96	-
N° 6	Metanol	+
N° 7	Agua destilada	+
N° 8	Dimetil sulfoxido	+++

-: Insoluble; +: Poco soluble; ++: Medianamente soluble; +++: Muy soluble

El extracto etanólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) fue muy soluble en Dimetil sulfoxido, poco soluble en solventes como metanol y agua destilada e insoluble para solventes apolares.

### III.2. Tamizaje fitoquímico

**Tabla 2.** Tamizaje fitoquímico

TUBO	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
N° 1	Borntrager	Antraquinonas	+
N° 2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
N° 3	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	++
N° 4	Dragendorff	Alcaloides	+++
N° 5	Mayer	Alcaloides	+
N° 6	Wagner	Alcaloides	++
N° 7	Baljet	Lactonas $\alpha,\beta$ -insaturadas	++
N° 8	Gelatina	Taninos	+
N° 9	Gelatina-sal	Taninos	+
N° 10	NaOH 10%	Antocianinas	+++
N° 11	Espuma	Saponinas	+
N° 12	Shinoda	Flavonoides	+

(-): Ausencia; (+): Mínima; (++) : Mediana (+++): Abundante presencia

En la tabla 2 se puede observar abundante presencia en las pruebas de, Cloruro férrico, Dragendorff y NaOH 10% hallándose lo siguiente: compuestos fenólicos, alcaloides y antocianinas; mediana presencia en las pruebas de, Liebermann-Burchard, Wagner y Baljet hallándose lo siguiente: terpenos y esteroides, alcaloides y lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas; mínima presencia en las pruebas de, Borntrager, Mayer, Gelatina, Gelatina-sal, Espuma y Shinoda hallándose lo siguiente: antraquinonas, alcaloides, taninos, saponinas y flavonoides.

### III 3. Ensayo microbiológico

**Tabla 3.** Halos de inhibición de ensayo microbiológico en *Streptococcus mutans*

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					Amoxicilina 25 µg	DMSO
	90%	50%	25%	5%			
<b><i>Streptococcus mutans</i></b> <b>ATCC 25175</b>	10.95	8.75	7.30	6		35.38	6
	10.92	8.77	7.33	6		35.39	6
	10.94	8.76	7.32	6		35.38	6
	10.95	8.76	7.30	6		35.40	6
	10.93	8.75	7.33	6		35.37	6
	10.95	8.74	7.31	6		35.38	6
	10.91	8.76	7.30	6		35.36	6
	10.93	8.75	7.34	6		35.38	6
	10.95	8.78	7.36	6		35.39	6
	10.94	8.76	7.32	6		35.38	6
<b>Media</b>	<b>10.94</b>	<b>8.76</b>	<b>7.32</b>	<b>6</b>		<b>35.38</b>	<b>6</b>

\*Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6 mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

\*Concentración del inóculo: 1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL

En la tabla 3 se evidencia los resultados del ensayo microbiológico in vitro. Esto hace evidencia que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo Amoxicilina 25 µg con 35,38 mm frente a *Streptococcus mutans*. Sin embargo, el grupo experimental al 90 % evidenció un halo de inhibición medio de 10,94 mm, seguido de los extractos al 50, 25 y 5 % con halos de inhibición medios de 8,76; 7,32 y 6 mm respectivamente.

**Tabla 4.** Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico

<b>Descriptivos</b>	
<b>Estadísticos</b>	
	Media <b>12,3995</b>
	Mediana <b>8,0500</b>
	Moda <b>6,00</b>
	Desv. Desviación <b>10,50624</b>
	Varianza <b>110,381</b>
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	Asimetría <b>1,728</b>
	Error estándar de asimetría <b>,309</b>
	Curtosis <b>1,202</b>
	Error estándar de curtosis <b>,608</b>
	Rango <b>29,40</b>

En la tabla 4 se evidencia la estadística descriptiva para las medidas de tendencia central (media, mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar) correspondientemente.

**Tabla 5.** Comparación de medias por el ANOVA

		<b>ANOVA</b>				
		Suma de	gl	Media	F	<b>Sig.</b>
		cuadrados		cuadrática		
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	Entre grupos	6512,471	5	1302,494	9315853,035	<b>,000</b>
	Dentro de grupos	,008	54	,000		
	<b>Total</b>	<b>6512,479</b>	<b>59</b>			

Se ejecutó un estadístico inferencial para determinar diferencia de medias mediante el análisis de varianzas (ANOVA).

La tabla 5 muestra un valor de significancia asintótica bilateral menor al 0.05 para los resultados del ensayo microbiológico in vitro con la cepa bacteriana *Streptococcus mutans*. Esto es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición medio de todos los grupos en el ensayo microbiológico según el estadístico ANOVA.

De igual importancia, para determinar si existen diferencias entre los halos de inhibición medio entre los grupos mediante múltiples comparaciones se utilizó el estadístico de Tukey.

La tabla 6 muestra que los valores de significancia asintótica bilateral son menores al 0.05 en las comparaciones entre el grupo Amoxicilina frente a los grupos experimentales que favorecen al grupo Amoxicilina. Esto es evidencia de que los grupos experimentales al 5 %, 25 %, 50 % y 90 % no superan el efecto inhibitorio de la Amoxicilina frente a la cepa *Streptococcus.mutans*.

Por otro lado, se muestra que el valor de la significancia asintótica bilateral es mayor al 0.05 en la comparación entre el grupo experimental al 5 % y el grupo (DMSO) en el ensayo microbiológico con la cepa bacteriana *Streptococcus.mutans*. Esto es evidencia de que no existe diferencias estadísticamente significativas entre el grupo al 5 % de experimentación y el control, evidenciando de que no existe actividad en el grupo al 5 %. Sin embargo, los valores de la significancia asintótica bilateral son menores al 0.05 entre los grupos experimentales al 25 %, 50 % y 90% en la comparación con el grupo (DMSO). Esto es evidencia de que si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales y el grupo DMSO.

**Tabla 6.** Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey

<b>HSD Tukey</b>							
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%		
					Límite inferior	Límite superior	
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>	DMSO	29,38100*	,00529	,000	29,3654	29,3966	
	5 %	29,38100*	,00529	,000	29,3654	29,3966	
	Amoxicilina	25 %	28,06000*	,00529	,000	28,0444	28,0756
	50%	26,62300*	,00529	,000	26,6074	26,6386	
	90%	24,44400*	,00529	,000	24,4284	24,4596	
	Amoxicilina	-29,38100*	,00529	,000	-29,3966	-29,3654	
	5 %	,00000	,00529	1,000	-,0156	,0156	
	DMSO	25 %	-1,32100*	,00529	,000	-1,3366	-1,3054
	50%	-2,75800*	,00529	,000	-2,7736	-2,7424	
	90%	-4,93700*	,00529	,000	-4,9526	-4,9214	

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## IV. DISCUSIÓN

En el presente estudio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare*, L. (orégano), el primer ensayo fue la prueba de solubilidad, los resultados mostraron que el extracto hidroalcohólico de orégano fue muy soluble en dimetilsulfóxido, y poco soluble en metanol y agua destilada. Por ser de naturaleza oleosa, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare*, L. (orégano) presentó mayor afinidad por el dimetilsulfóxido, el cual es un solvente muy apropiado para esta clase de agentes insolubles en agua y que además presenta propiedades biológicas aún no estudiadas que podrían colocarlo como un disolvente adecuado para infiltrar fármacos que actúen directamente a nivel de la matriz extracelular. De igual importancia el DMSO (dimetilsulfóxido) es una molécula anfipática con un dominio altamente polar y dos grupos metilo apolares, por lo que es soluble tanto en los medios acuosos como en los orgánicos.

Por otro lado, respecto al ensayo del tamizaje fitoquímico fueron los compuestos fenólicos, alcaloides y antocianinas, los de mayor presencia; empleando según el método Olga Lock, metabolitos responsables de las actividades biológicas.

Asimismo, el presente estudio coincide con la investigación de Peralta Y. (2018) quien realizó el tamizaje fitoquímico de extractos de *Origanum vulgare* L. (orégano), mostrando resultados positivos para compuestos fenólicos, flavonoides, cumarinas, quinonas, terpenos y esteroides<sup>55</sup>. Esto demuestra que a pesar de ser muestras de diferentes lugares, tienen una composición fitoquímica similar.

De igual importancia, también coincide con el estudio de Gavilanez S. (2020) quien realizó el perfil fitoquímico del orégano, demostrando la presencia de flavonoides, triterpenos, quinonas, saponinas, alcaloides, azúcares reductores, compuestos fenólicos en mayor proporción<sup>56</sup>. Estos hallazgos son fundamentales para la relación de los metabolitos presentes en *Origanum vulgare* L. y sus aplicaciones biológicas con fines medicinales en beneficio de la población.

Por otro lado, respecto al ensayo microbiológico para evaluar el impacto antibacteriano in vitro, del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare*, L. (orégano) a las concentraciones del 25 %, 50 % y 90 % frente a cepas

de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, evidenció que el extracto al 90 % generó un halo de inhibición medio de 10,94 mm, seguido de los extractos al 50 % y 25 % con halos de inhibición medios de 8,76 mm y 7,32 mm respectivamente. Además, se evidenció que los 3 grupos experimentales presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) por las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey, y según la escala de Duraffourd esta cepa bacteriana es sensible sólo para el extracto al 50 % y 90 %.

De igual importancia coincide con el estudio de Vázquez J, (2019), quien evaluó el desarrollo antibacteriano in vitro del extracto líquido de *Origanum Vulgare L.* frente a *Streptococcus mutans* a concentraciones de 10 %, 50 % y 100%, hallando actividad antibacteriana<sup>43</sup>. Asimismo, coincide con la investigación de Schovelin A, et al (2018), quienes analizaron el impacto antibacterial del *Origanum vulgare L.* frente a *Streptococcus mutans*, demostrando que el *Origanum vulgare L.* presenta actividad antibacteriana a concentraciones mayores de 20 % y con futuras aplicaciones en enjuague bucal, pasta de dientes o demás adyuvantes de la limpieza bucal para prevenir la frecuencia de las caries<sup>41</sup>.

Finalmente coincide con el estudio de Badekova Z, et al (2021), quienes evaluaron la actividad antibacteriana de una formulación gel en base a *Origanum Vulgare*, obteniendo resultados prometedores y eficaces frente a *Streptococcus mutans* que se caracteriza por ser un agente bacteriano relacionado con las caries e infecciones periodontales<sup>39</sup>.

El orégano es una especie vegetal de fácil alcance, económico y sobre todo queda demostrado sus propiedades antibacterianas, es por ello que se convierte como alternativa natural frente a infecciones dentales que aqueja a la población peruana que no son principalmente pacientes asiduos de las consultas odontológicas.

#### IV.1. Conclusiones

- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare*, L. (orégano) presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Los metabolitos secundarios que se detectaron en la prueba de tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare* L. (orégano) responsables de la actividad antibacteriana, fueron los compuestos fenólicos, antocianinas y alcaloides.
- La concentración que presenta efecto antibacteriano in vitro frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue del 25 %, 50 % y 90 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare* L. (orégano).
- El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare* L. (orégano) al 5 %, 25 %, 50 % y 90 % no superan el efecto inhibitor de la Amoxicilina 25 µg frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## IV.2. Recomendaciones

- Realizar estudios comparativos antimicrobianos del *Origanum vulgare*, L. (orégano) de diferentes lugares de recolección del Perú, para evaluar el mejor estudio.
- Iniciar estudios antimicrobianos con las flores, raíz y tallo del *Origanum vulgare*, L. (orégano).
- Proponer diferentes técnicas microbiológicas con *Origanum vulgare* L. (orégano) para evaluar los mejores resultados.
- Realizar formulaciones a base de orégano y contrastar su capacidad antibacteriana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dorri M, Martinez M, Walsh T, Marinho V, Sheiham A, Zaror C. Atraumatic restorative treatment versus conventional restorative treatment for managing dental caries. 1st ed. Chile: Cochrane Oral Health Group; 2017.
2. Nagamine Y, Khaleque H, Takaaki O, Ayano T, Kazuyo K, Akram H, et al. D-Tagatose Effectively Reduces the Number of Streptococcus mutans and Oral Bacteria in Healthy Adult Subjects: A Chewing Gum Pilot Study and Randomized Clinical Trial. Vol. 74. Kagawa University; 2020.
3. Guerra F, Mazur M, Ndokaj A, Corridore D, La Torre G, Polimeni A, et al. Periodontitis and the microbiome: A systematic review and meta-analysis. Vol. 67. University of rome; 2018.
4. Almoudi M, Hussein A, Abu M, Schroth R. Dental caries and vitamin D status in children in Asia. Vol. 61. University of Manitoba. Canada; 2019
5. Teshome A, Muche A, Girma B. Prevalence of Dental Caries and Associated Factors in East Africa, 2000–2020: Systematic Review and Meta-Analysis. Universidad de Gondar; 2021.
6. Papadaki S, Douglas G, Hanibani A, Kang J. Gender Differences in Caries and Periodontal Status in UK Children. University of Leeds; 2021.
7. Iole V, Capasso F, Marrese E, Polimeni A, Ottolenghi L. Infant and Child Oral Health Risk Status Correlated to Behavioral Habits of Parents or Caregivers: A Survey in Central Italy. University of Rome; 2017.
8. Pitts B, Ekstrand K, Ramos F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G. Dental caries. Nat Rev Dis Prim. 2017;3(17):1–16.
9. Rozier R, White B, Slade D. Trends in Oral Diseases in the U.S. Population. J Dent Educ. 2017;81(8):97–109.
10. Quenguan J, Guisao A, Cardona J, Correa L, Agudelo A. Planes, políticas públicas y estrategias de salud bucal en Latinoamérica y el Caribe (1991-2018). Rev Cubana Estomatol. 2021;58(2):3175–88.
11. Ojeda R, Dávila K. Prevalencia de caries dental en niños de la Clínica Estomatológica de la Universidad de Señor de Sipán. Rev Salud Vida Sipanense. 2017;4(2):14–9.

12. Silveira P, Martins P, Martins S. Prevalence of self-reported dental pain and associated factors among eight- to ten-year- old Brazilian schoolchildren. *PLoS One*. 2019;14(4):1–13.
13. Taboada O, Rodríguez K. Prevalencia de placa dentobacteriana y caries dental en el primer molar permanente en una población escolar del sur de la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2018;75(2):113–8.
14. Espinoza G, Pineda P, Atala C, Muñoz P, Muñoz S, Weits A. Prevalencia y Severidad de Caries Dental en los Niños Beneficiarios del Programa de Salud Oral Asociados a Escuelas de Chile Prevalence. *Int J Odontostomatol*. 2021;15(1):166–74.
15. Aquino C, Ojeda R, Díaz A. Prevalencia, Experiencia y Significancia de caries dental en escolares de Cutervo-Perú. *Rev OACTIVA*. 2018;3(2):21–4.
16. Galecio R, Rojas S. Impacto de la caries dental en la calidad de vida de escolares del distrito La Victoria. Lambayeque, Perú. *Odontol Pediatr*. 2018;17(2):24–31.
17. Pesaressi E, Rita S, Ewald M, Jo E. Caries dental en niños preescolares de 3 años en Lima-Perú evaluados con el instrumento CAST. *Acta Odontol Latinoam*. 2020;33(2):90–7.
18. Frencken J, Sharma P, Stenhouse L, Verde D, Lavery D, Dietrich T. Epidemiología mundial de la caries dental y la periodontitis grave: una revisión exhaustiva. *Revista de Periodoncia Clínica*. 2017;44(18):94-105.
19. Pitts N, Zero D, Marsh P, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3.
20. Nasseripour M, Newton J, Warburton F, et al. A systematic review and meta-analysis of the role of sugar-free chewing gum on *Streptococcus mutans*. *BMC Oral Health*. 2021; 21:217.
21. Kressirer C, Smith D, King W, Dobeck J, Starr J, Tanner A, Scardovia *wiggisiae* and its potential role as a caries pathogen. *Journal of Oral Biosciences*. 2017; 59(3):135-141.
22. Teshome A, Muche A, Girma B. Prevalence of Dental Caries and Associated Factors in East Africa, 2000-2020: Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Public Health*. 2021;9.

23. Sivamaruthi B, Kesika P, Chaiyasut, C, A Review of the Role of Probiotic Supplementation in Dental Caries. *Probiotics & Antimicrobial Prot.* 2020;12:1300–1309.
24. Arévalo P, Cuenca K., Vélez E, Villavicencio B, Estado nutricional y caries de infancia temprana en niños de 0 a 3 años: Revisión de la literatura. *Revista odontología pediátrica.* 2021;20(1):49-59.
25. Castillo J, Palma C, Cabrera A, Early Childhood Caries in Peru. *Front. Public Health.* 2019; 7:337
26. Acosta CMG, Palencia L, Santaella J, et al. El uso de fluoruros en niños menores de 5 años. Evidencia. Revisión bibliográfica. *Rev Odotopediatr Latinoam.* 2020; 10(1):82-92.
27. Araque M, Chacón R, Lujano H, Maldonado A, Márquez J, Meza A. Salud bucal de personas en situación de calle: una revisión sistemática. *IDEULA.* 2021; 1:11-39.
28. Pavón A, Collantes J, Rockenbach M, Carrillo K, Importancia de la educación y el factor socioeconómico de los padres en la prevalencia de caries dental en niños en edades escolares, una revisión de la literatura. *Sinergia Académica.* 2022;5(1):22-36.
29. Zanini M, Tenenbaum A, Azogui S. La caries dental, un problema de salud pública. *EMC - Tratado de medicina.* 2022;26(1):1-8.
30. Landa C, et al. Caries de la infancia temprana, una revisión contemporánea. *Contexto Odontológico.* 2019;9(18):64-73.
31. Meyer F, Enax J, Early Childhood Caries: Epidemiology, Aetiology, and Prevention. *International Journal of Dentistry.* 2018;11-8.
32. Matamala A, Rivera F, Zaror C, Impacto de la caries en la calidad de vida relacionada con la salud oral de adolescentes: Revisión sistemática y metaanálisis. *Int. J. Odontostomat.* 2019;13(2):219-229.
33. Oniga I, Pus C, Silaghi R, Neli O, Sevastre B, Marica R, et al. *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical Composition and Biological Studies. *Molecules.* 2018;23(8):1–14.
34. Tamara F, Brito G, Novoa C, Sagñay T, Samaniego M, Tacán P, et al. Análisis comparativo de las propiedades fisicoquímicas y capacidad antioxidante de un morfotipo de orégano (*Origanum vulgare L.*) cultivado en dos localidades de la Sierra Ecuatoriana. 2020;8(1):1–10.

35. Salazar B, Rodríguez B, Betancourt H, Martínez A. Análisis de los metabolitos secundarios del polvo de hojas de *Origanum vulgare* y *Ficus pandurata*. Rev Prod Anim. 2019;31(1):61–3.
36. Lemos J, Palmer S, Zeng L, Wen Z, Kajfasz J, Freires I, et al. The biology of streptococcus mutans. Vol. 7. New Orleans: Microbiology Spectrum; 2019. 435–448 p.
37. Zhiyan H, Huang J, Zhou W. Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde on Streptococcus mutans Biofilms. Front Microbiol. 2019; 10:1–11.
38. Karthi S, Bhagavathi H, Udayashankar A, Shogan S, Akhila P, Tamilarasi S. Guardian genes ensuring subsistence of oral Streptococcus mutans. Crit Rev Microbiol. 2020;46(4):475–91.
39. Badekova Z, Atazhanova A, Kacergius T, Akhmetova B, Smagulov K. Formulation of an *Origanum vulgare* based dental gel with antimicrobial activity. J Taibah Univ Med Sci. 2021;16(5):712–8.
40. Karadağlıoğlu İ, Ulusoy, Başer C, Hanoğlu A, Şık İ. Antibacterial activities of herbal toothpastes combined with essential oils against streptococcus mutans. Pathogens. 2019;8(1):1–17.
41. Schovelin A, Muñoz M. Efecto Antibacteriano de la Infusión de Orégano (*Origanum vulgare*) sobre el crecimiento in Vitro de Streptococcus mutans, 2015. Int J Odontostomatol. 2018;12(4):337–42.
42. Vilca J. Efecto antibacteriano in vitro de tres concentraicones de aceite esencial de *Origanum vulgare* de Otuzco sobre Streptococcus mutans ATCC 25175, Trujillo 2017. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote; 2021.
43. Vásquez J. Actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso del *Origanum vulgare* sobre los Streptococcus mutans, distrito de Chimbote, Provincia del Santa, departamento de Ancash, 2018. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote; 2021.
44. Albines W. Efecto antibacteriano in vitro del Syzygium aromaticum “Clavo De Olor” y *Origanum Vulgare* “Orégano” frente a Streptococcus Mutans ATCC 25175, Trujillo 2020. Universidad Privada Antenor Orrego; 2020.
45. Villavicencio J. Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de Candida albicans. Odontol Sanmarquina. 2017;19(2):5–8.

46. Salazar B, Rodríguez B, Betancourt H, Martínez A. Análisis de los metabolitos secundarios del polvo de hojas de *Origanum vulgare* y *Ficus pandurata*. Rev Prod Anim. 2019;31(1):61–3.
47. Hernandez R, Fernandez C, Baptista M. Metodología de la Investigación. 6ta edicio. México: Mc Graw Hill; 2014.
48. Cegarra J. Metodología de la investigación científica y tecnológica. 1st ed. Madrid: Diaz de Santos; 2004. 372 p.
49. Hernandez R, Mendoza C. Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. 1st ed. Mexico: Mc Graw Hill; 2018. 751 p.
50. Mejía G, Olortegui A. Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Morinda Citrifolia* (Noni), in Vitro frente a cepas de *Escherichia Coli* ATTC 25922 - 2021. Universidad Roosevelt; 2021.
51. Lock O. investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 3rd ed. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2016. 287p.
52. Alejandra J, Castillo M, Cumandá M, Ibarra B. Eficacia inhibitoria del aceite esencial de *Cymbopogon Citratus* sobre cepas de *Porphyromona Gingivalis*: Estudio in vitro. 2018;20(2).
53. Oniga I, Pus C, Silaghi R, Neli O, Sevastre B, Marica R,. *Origanum vulgare* ssp. vulgare: Chemical Composition and Biological Studies. Molecules. 2018;23(8):1–14.
54. Brítez J. La Ética en investigaciones humanas y el Comité de Ética. Rev virtual Soc Parag Med Int. 2016;3(1):8–10.
55. Peralta, Y. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Origanum vulgare* L. "Orégano" en ratas albinas. [Tesis]. PE: Universidad San Pedro; 2019. <http://repositorio.usanpedro.edu.pe/handle/USANPEDRO/9257>
56. Gavilanez Montesdeoca Sixto Alejandro (2020); Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir del orégano (*Origanum vulgare* L.). UTC. Latacunga. 80 p.

## ANEXO A

Tabla A: Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS		
Metabolitos secundarios	Reactivos	Resultado
Quinonas	Borntrager	
Compuestos fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	
Flavonoides	Shinoda	
Antocianinas	NaOH 10 %	
Taninos	Gelatina	
Taninos	Gelatina Sal	
Alcaloides	Dragendorff	
Alcaloides	Wagner	
Alcaloides	Mayer	
Triterpenos y Esteroides	Liebermann Burchard	
Lactonas $\alpha$ , $\beta$ insaturadas	Baljet	
Saponinas	Espuma	

**Donde:**

(-) Ausente

(+) Escaso

(++) Leve

(+++) Moderado

(++++) Abundante

**Tabla B: De recolección de datos de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico**

CEPAS	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175											
Concentración del extracto hidroalcohólico (%)	Halos de inhibición (mm)											
	N										X	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
90												
50												
25												
5												

**n: número de ensayos microbiológicos**

**X: promedio**

## ANEXO B: Matriz de consistencia

### Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare L.* (Orégano) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVOS GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		
¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	Determinar el efecto antibacteriano in vitro, del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) presenta efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<b>V1.</b>	<b>DIMENSIÓN</b>	<b>INDICADORES</b>
<b>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>HIPÓTESIS ESPECÍFICAS</b>	Extracto hidroalcohólico de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano)	Fitoquímico Concentraciones al 5 %, 25 %, 50% y 100 %	Prueba de solubilidad  Identificación de metabolitos secundarios  Reacciones químicas de precipitación y coloración.
P.E.1: ¿Qué metabolitos secundarios tiene el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano)? P.E.2: ¿Cuál es la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) que posee efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175? P.E.3: ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) en comparación con amoxicilina 25 µg sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	O.E.1: Detectar los metabolitos secundarios que tiene el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano)  O.E.2: Precisar la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) que posee efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175  O.E.3: Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) en comparación con amoxicilina 25 µg sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	H.E.1: El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano) tiene metabolitos secundarios H.E.2: El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) presenta concentraciones que poseen efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. H.E.3: El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> (orégano) tiene efecto antibacteriano in vitro en comparación con amoxicilina 25 µg sobre <i>Streptococcus mutans</i> .			
			<b>V2.</b>	<b>DIMENSIÓN</b>	<b>INDICADORES</b>
			Efecto antimicrobiano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Microbiológico.	Medición del diámetro de inhibición (halos de inhibición).

## ANEXO C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	Tipo de variable	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	N° ITEM	VALOR FINAL	CRITERIOS
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>  Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> (Orégano)	Cualitativo y Longitudinal	Mezcla compleja compuesta por metabolitos primarios y secundarios extraídos con etanol	Se realizará la prueba de solubilidad con solventes de diferente polaridad y el análisis fitoquímico respectivo	Fitoquímico  Concentraciones	Pruebas de solubilidad  Identificación de metabolitos secundarios  Reacciones químicas de precipitación y coloración	14	(-) Ausente (+) Escaso (++) Leve (+++) Moderado (++++) Abundante	<b>Rango de presencia o ausencia</b>
<b>VARIABLE DEPENDIENTES</b>  Efecto antibacteriano in vitro sobre streptococcus mutans	Cuantitativo y Longitudinal	Aplicación terapéutica que posee una determinada sustancia para causar lisis o detener el crecimiento de un agente bacteriano	La cepa de Streptococcus mutans, se procederá a sembrar en placas Petri, junto con discos controles y experimentales a diversas concentraciones (5 %, 25 %, 50% y 90 %) para luego realizar la medición de diámetro inhibición (mm).	<b>Microbiológico</b>	Medición de diámetro inhibición (mm) al 5 %, 25 %, 50 % y 90 %	10	6 mm: nulo 8 – 14 mm: Sensibilidad límite 14 – 20 mm: Medio <20 mm: Muy sensible	<b>Evidencia de inhibición de crecimiento</b>

## ANEXO D. Certificado Taxonómico



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO - CBP N° 3796 - INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### CERTIFICA:

Que, MARTÍNEZ CAJAHUANCA, ROSARIO BEATRIZ Y CÓRDOVA ZORRILLA, EDUARDO FRANCO; tesistas en la Universidad María Auxiliadora, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente del distrito y provincia de Candarave, del departamento de Tacna, donde es cultivada y conocida con el nombre vulgar de "orégano", la muestra fértil con flores y frutos ha sido estudiada e identificada con el nombre científico de *Origanum vulgare* L. Según la base de Trópicos que sigue el Sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009) y APG IV (2016), este Sistema de clasificación considera a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida (Chasse, MW y JL. Reavel. 2009), la muestra vegetal estudiada se ubica en las siguientes categorías taxonómicas.

**Reino: Plantae**

**División: Angiospermae**

**Clase: Equisetopsida**

**Subclase: Magnoliidae**

**Superorden: Asterales**

**Orden: Lamiales**

**Familia: Lamiaceae**

**Género: *Origanum***

**Especie: *Origanum vulgare* L.**

Nombre vulgar: "orégano"

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 06 de noviembre del 2021



JR. SANCHEZ SILVA N° 156- piso 2. Urb. Santa Luzmila. Lima 07  
Email: jocamde@gmail.com; joricampos@yahoo.es

## ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

### Informe de Resultados

Solicitado por: MARTINEZ CAJAHUANCA, ROSARIO BEATRIZ  
CÓRDOVA ZORRILLA, FRANCO EDUARDO

Muestra: Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Origanum vulgare* (orégano)

Cantidad: 10 gr

Fecha de ensayo: 29-01-2022

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	90%	50%	25%	5%	Amoxicilina	DMSO
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	10.95	8.75	7.30	6	35.38	6
	10.92	8.77	7.33	6	35.39	6
	10.94	8.76	7.32	6	35.38	6
	10.95	8.76	7.30	6	35.40	6
	10.93	8.75	7.33	6	35.37	6
	10.95	8.74	7.31	6	35.38	6
	10.91	8.76	7.30	6	35.36	6
	10.93	8.75	7.34	6	35.38	6
	10.95	8.78	7.36	6	35.39	6
	10.94	8.76	7.32	6	35.38	6

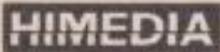
\*Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6 mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

\*Concentración del inoculo:  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL



Lic. T.M. Walter A. Sir Rodríguez  
CTMP. 10808

# ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton



Certified : ISO 9001:2008, ISO 13485:2012 and WHO GMP

**HIMedia Laboratories Private Limited**  
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg, Mumbai - 400086  
 Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

<b>Material Code :</b> M173	<b>Material Name :</b> Mueller Hinton Agar	<b>Lot No :</b> 0900322697
<b>Report No.:</b> 840080779434	<b>Date of Report :</b> 22.12.2017	<b>Expiry Date :</b> Dec-2022

**Appearance**  
 Cream to yellow homogeneous free flowing powder . Observed : Light yellow

**Gelling**  
 Firm, comparable with 1.7% agar gel.

**Colour and Clarity of prepared medium**  
 Light amber coloured clear to slight opalescent gel forms in Petri plates.

**Reaction**  
 Reaction of 3.8% w/v aqueous solution at 25°C.

**pH**  
 pH Range :7.20-7.40 Observed : 7.37

**Cultural Response**  
 Cultural characteristics observed after incubation at 30-35°C for 18 -24 hours for bacterial cultures. For testing *S.pneumoniae* : The medium was supplemented with 5% Sheep blood and incubated at 35°C for 18-18 hours at 5% CO2 For testing *H.influenzae* : Yeast extract & 2 vials /l of Haemophilus Growth Supplement (FD117 containing 15 mg/l of Haematin+ 15 mg/l of NAD) and incubated at 35°C for 20-24 hours at 5% CO2

**Antibiotic Sensitivity test**  
 Various discs were tested for standard ATCC strains and zone of inhibition were measured after an incubation 30-35°C for 18 hours. (As per the latest CLSI Protocol M6 & Standards as per the current CLSI M100)

**Thymine/Thymidine Content**  
 # The zones for these discs are indicative of the Thymine/Thymidine content of the medium.

**Divalent Cation Content**  
 \* The zones for these discs are indicative of the Divalent Cation content of the medium

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Observed Lat water (CFU)	Recovery	Standard Zone	Zone of inhibition Observed
<b>Escherichia coli ATCC 25922(WDCM 00013)</b>						
Growth promoting	85	luxuriant	80	94%	-	-
Amoxicillin AMC 30 mcg	-	-	-	-	18-24 mm	23mm
Ampicillin AMP 10 mcg	-	-	-	-	16-22 mm	21mm
Cefotaxime CTX 30 mcg	-	-	-	-	29-35 mm	34mm
Cefoxitin CE 30 mcg	-	-	-	-	23-29 mm	27mm
Cephadrin CEP 30mcg	-	-	-	-	15-21 mm	20mm
Chloramphenicol C 30 mcg	-	-	-	-	21-27 mm	26mm
Ciprofloxacin CIP 5mcg	-	-	-	-	30-40 mm	38mm

PAGE : 1/4

**Himedia Laboratories Private Limited**

21, Vaidani Industrial Estate, L.R.S. Marg, Mumbai - 400066

Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

<b>Material Code :</b> BH73	<b>Material Name :</b> Mueller Hinton Agar	<b>Lot No. :</b> 080022087
<b>Report No.:</b> 04000776014	<b>Date of Report :</b> 22.12.2017	<b>Expiry Date :</b> Dec-2020

Chloramphenicol 100 mg	-	-	-	-	19-20 mm	10mm
Sulphadiazole 50 mg	-	-	-	-	15-21 mm	11mm
Tetracycline 10 mg	-	-	-	-	18-21 mm	14mm
Ca-Floxacinolone 10 mg	-	-	-	-	17-20 mm	16mm
<b>Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034)</b>						
Control preparation	SI	Isolated	TI	WPL	-	-
Amoxicillin 400 mg	-	-	-	-	28-30 mm	15mm
Ampicillin/Sulbactam 4:5 (100 mg)	-	-	-	-	28-37 mm	16mm
Cephalexin 500 mg	-	-	-	-	29-37 mm	15mm
Ciprofloxacin 100 mg	-	-	-	-	22-30 mm	16mm
Cyclizine 50 mg	-	-	-	-	22-30 mm	15mm
Erythromycin 100 mg	-	-	-	-	25-33 mm	16mm
Linezolid 100 mg	-	-	-	-	18-24 mm	15mm
Moxifloxacin 400 mg	-	-	-	-	21-28 mm	17mm
Nitrofurantoin 50 mg	-	-	-	-	14-30 mm	15mm
Vancomycin 500 mg	-	-	-	-	17-21 mm	15mm
Ca-Floxacinolone 100 mg	-	-	-	-	24-32 mm	16mm
Ceftazidime 100 mg	-	-	-	-	25-29 mm	16mm
<b>Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025)</b>						
Control preparation	SI	Isolated	TI	WPL	-	-
Amikacin 40 mg	-	-	-	-	18-20 mm	10mm
Aztreonam 40 mg	-	-	-	-	23-29 mm	16mm
Ceftazidime 100 mg	-	-	-	-	18-22 mm	11mm
Cefepime 100 mg	-	-	-	-	23-29 mm	16mm
Ciprofloxacin 100 mg	-	-	-	-	25-31 mm	12mm
Colistin 100 mg	-	-	-	-	16-21 mm	10mm
Imipenem 100 mg	-	-	-	-	28-28 mm	17mm
Piperacillin 500 mg	-	-	-	-	18-21 mm	12mm
Piperacillin/ tazobactam 4:1 (100 mg)	-	-	-	-	29-28 mm	16mm
Tobramycin 100 mg	-	-	-	-	14-21 mm	14mm
<b>Escherichia coli ATCC 35218</b>						
Control preparation	SI	Isolated	TI	WPL	-	-
Amoxicillin 400 mg	-	-	-	-	17-22 mm	11mm
Ampicillin 400 mg	-	-	-	-	6 mm	6mm
Ampicillin/Sulbactam 4:5 (100 mg)	-	-	-	-	13-19 mm	17mm

HIMEDIA Laboratories Private Limited  
 13, Vaikunth Industrial Estate, L.R.S. Marg, Mumbai - 400066  
 Website | www.himedialabs.com, Email | info@himedialabs.com

**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

<b>Material Code :</b> M173	<b>Material Name :</b> Mueller Hinton Agar	<b>Lot No. :</b> 000002007
<b>Report No.:</b> 00000776024	<b>Date of Report :</b> 22.12.2017	<b>Expiry Date :</b> Dec-2022

<i>Demecolite</i> 0.150 mg	-	-	-	-	12-18 mm	15mm
<i>Piperacillin/Tazobactam</i> AT 100/40 mg	-	-	-	-	14-20 mm	25mm
<i>Demecolite</i> 0.12 mg	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Tetracycline/Clavulanic acid</i> TCC 75/15mg	-	-	-	-	21-27 mm	25mm
<b>Enterococcus faecalis ATCC 29212 (WDCM 03087)</b>						
Growth monitoring	88	Inoculated	88	95%	-	-
<i>Os-Tetracycline</i> OUF 20 mg	-	-	-	-	# 20 mm (Clear zone)	25mm
<i>Tetracycline</i> TR 2 mg #	-	-	-	-	# 20 mm	25mm
<i>Fusidic acid</i> FA 50 mg	-	-	-	-	# 17 mm	25mm
<b>Staphylococcus aureus ATCC 43308 (MRSA) (WDCM 03211)</b>						
Growth monitoring	88	Inoculated	88	0	-	-
<i>Demecolite</i> DM / mg	-	-	-	-	Very Heavy to No zone	No zone
<b>Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 (On Medium with 5% Sheep Blood)</b>						
Growth monitoring	88	Inoculated	76	95%	-	-
<b>Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (Incubated w/5% CO2)</b>						
Growth monitoring	88	Inoculated	88	94%	-	-
<b>Haemophilus influenzae ATCC 49247 (On medium w/ Y.E.,MAD &amp; Hematin)</b>						
Growth monitoring	88	Inoculated	78	93%	-	-

- ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
- NCTC and National Collection of Type Cultures are registered trade mark of the Health Protection Agency

**Control Media :**

- For Bacteria : Soyabean Casein Digest Agar / Columbia Blood Agar base enriched with 5% v/v Sheep/ Horse blood.
- For Yeast & Mold : Sabouraud Dextrose Agar.

- All ISO 11133:2014 (B) control strains are included in the Quality parameter
- HIMEDIA Laboratories Pvt Ltd is certified for ISO 9001:2008, ISO 13485:2012 and WHO GMP.

**Information for BSE/TSE Risk:** The material was subjected to pH 4-7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) and its variants are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal Preservation Act/Govt. of Maharashtra, India.

**HIMedia Laboratories Private Limited**

23, Vaidyan Industrial Estate, L.R.S. Marg, Mumbai - 400066

Website : www.himedialabs.com, Email : info@himedialabs.com

**Certificate of Analysis, Quality and Conformity**

<b>Material Code :</b> M173	<b>Material Name :</b> Master Hinton Agar	<b>Lot No :</b> 000002007
<b>Report No.:</b> 04000779434	<b>Date of Report :</b> 22.12.2017	<b>Expiry Date :</b> Dec-2021

**STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED**

This is to certify that this lot passes and it conforms to the above mentioned tests and specifications. The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particular use, other than that specified in the current HIMedia manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

*This document has been produced electronically and is valid*



Microbiologist/ Sr. Executive  
Microbiologist



Asst. Dy/QC Manager



Dy/QA Manager

22.12.2017

## ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa *Streptococcus mutans*



### Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Streptococcus mutans</i> Catalog Number: 0268 Lot Number: 266-32** Reference Number: ATCC® 25175™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2022/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Quevi Release Date: 2020/9/8
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types: small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains	<b>Method:</b> Gram Stain (1)

<b>ID System: MALDI-TOF (1)</b> See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
-----------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

\*\*Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



### Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

### Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2020-09-02T11:47:04.268 ads

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B10 (+++) (A)	266-32	Streptococcus mutans	2.14

Comments:

n/a
-----

## ANEXO H. Evidencias fotográficas

FIGURA 1.



Selección de la muestra

FIGURA 2.



Procedimiento de lavado de muestra

**FIGURA 3**



Procedimiento de secado de la muestra

**FIGURA 4**



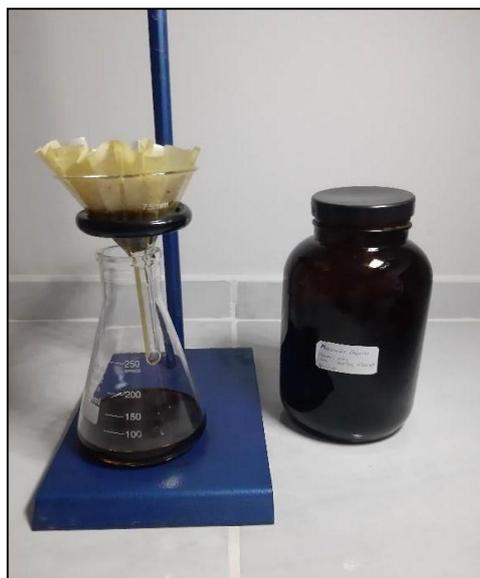
Procedimiento de molienda de la muestra

**FIGURA 5**



Preparación del macerado del extracto etanólico

**FIGURA 6**



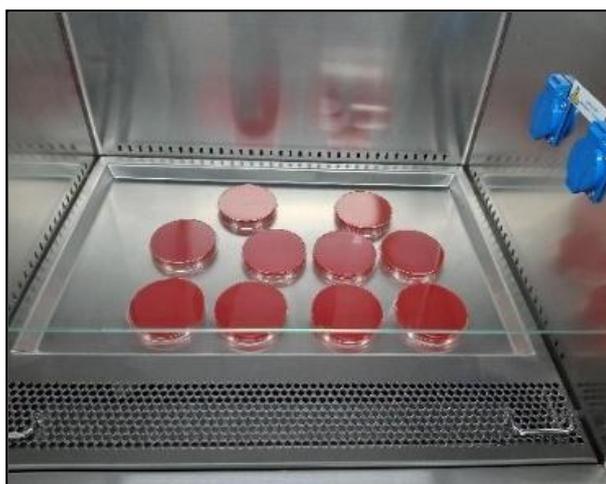
Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico

**FIGURA 7**



Obtención del extracto seco

**FIGURA 8**



Preparación de medio de cultivo

**FIGURA 9**



Activación de la cepa

**FIGURA 10**



Inoculación de las placas

**FIGURA 11**



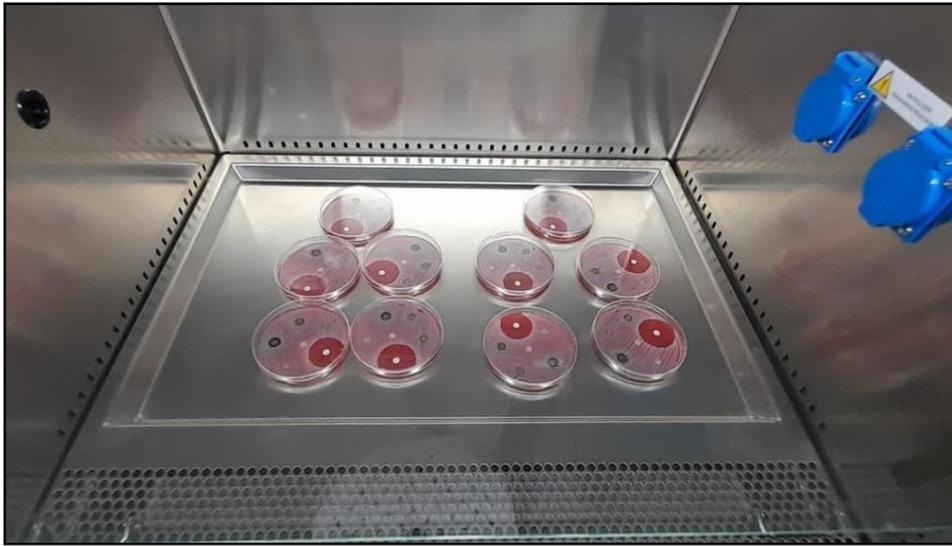
Preparación de los discos de sensibilidad

**FIGURA 12**



Colocación de discos

**FIGURA 13**



Incubación

**FIGURA 14**



Lectura de resultados