



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

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Opuntia soehrensii*  
Britton & Rose (AYRAMPO) FRENTE A CEPAS DE  
*Streptococcus mutans* ATCC 25175**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO

**AUTORES:**

Bach. PALACIOS ROSALES, MARY CRUZ  
<https://orcid.org/0009-0003-8678-9400>

Bach. COILA COLQUEHUANCA, ROSIO OBDULIA  
<https://orcid.org/0009-0002-1184-3196>

**ASESOR:**

Mg. PINEDA PÉREZ MARIO NEUMAN  
<https://orcid.org/0000-0001-6818-7797>

LIMA – PERÚ

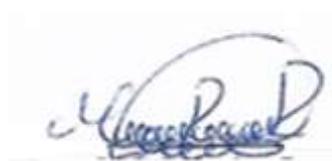
2023

## AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, Palacios Rosales Mary Cruz, con DNI **45808309**, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de "Químico Farmacéutico", **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, **DECLARO BAJO JURAMENTO**<sup>1</sup> que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de 19 % y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 31 días del mes de marzo del año 2023.



---

Palacios Rosales, Mary Cruz  
46319989



---

Mg. Pineda Pérez, Mario Neuman  
09410930

---

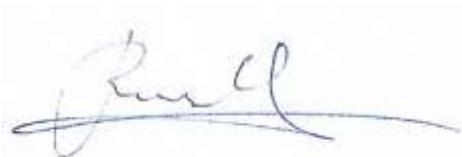
<sup>1</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos – RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

## **AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD**

Yo, Coila Colquehuanca Rosio Obdulia, con DNI **46319989**, en mi condición de autor(a) de la tesis/ trabajo de investigación/ trabajo académico presentada para optar el Título Profesional de "Químico Farmacéutico", **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, **DECLARO BAJO JURAMENTO**<sup>2</sup> que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de 19 % y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 31 días del mes de marzo del año 2023.



\_\_\_\_\_  
Coila Colquehuanca, Rosio Obdulia  
46319989



\_\_\_\_\_  
Mg. Pineda Pérez, Mario Neuman  
09410930

<sup>2</sup> Se emite la presente declaración en virtud de lo dispuesto en el artículo 8°, numeral 8.2, tercer párrafo, del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos conducentes a Grados y Títulos – RENATI, aprobado mediante Resolución de Consejo Directivo N° 033-2016-SUNEDU/CD, modificado por Resolución de Consejo Directivo N° 174-2019-SUNEDU/CD y Resolución de Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD.

# TESIS EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO

## INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://repositorio.uma.edu.pe">repositorio.uma.edu.pe</a> Fuente de Internet	13%
2	<a href="http://repositorio.uladech.edu.pe">repositorio.uladech.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
3	<a href="http://repositorio.uap.edu.pe">repositorio.uap.edu.pe</a> Fuente de Internet	2%
4	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	1%
5	<a href="http://www.dspace.unitru.edu.pe">www.dspace.unitru.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
6	<a href="http://repositorio.uandina.edu.pe">repositorio.uandina.edu.pe</a> Fuente de Internet	1%
7	Submitted to Universidad de Málaga - Tii Trabajo del estudiante	1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Activo

### **Dedicatoria**

Dedicamos este logro a nuestros hijos con todo nuestro amor, pues fueron nuestra fuente de inspiración. Al mismo tiempo a nuestra familia por su dedicación, orientación y apoyo incondicional contribuyendo al logro de nuestra meta profesional.

### **Agradecimiento**

A Dios en primer lugar por guiarnos en el camino y llegar a nuestro objetivo, del mismo modo a nuestra familia por su apoyo incondicional para lograr este sueño y también a nuestros maestros que infundieron sus enseñanzas para formarnos como profesionales.

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. MATERIALES Y METODOS</b>	6
II.1. Enfoque y diseño de la investigación.	6
II.2. Población, Muestra y Muestreo	6
II.3. Variables de investigación.	7
II.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos	7
II.5. Plan metodológico para la recolección de datos	8
II.6. Métodos de análisis estadístico	10
II.7. Aspectos éticos	10
<b>III. RESULTADOS</b>	11
<b>IV. DISCUSIÓN</b>	18
IV.1. Discusiones	18
IV.2. Conclusiones	20
IV.3. Recomendaciones	21
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	22
<b>ANEXOS</b>	27
<b>ANEXO A.</b> Operacionalización de las variables	28
<b>ANEXO B.</b> Instrumento de recolección de datos	29
<b>ANEXO C.</b> Matriz de consistencia	31
<b>ANEXO D.</b> Informe de laboratorio	32
<b>ANEXO E.</b> Certificado Taxonómico	33
<b>ANEXO F.</b> Evidencias de campo	34
<b>ANEXO G.</b> Certificado de Agar Mueller Hinton	49

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Ensayo de solubilidad	11
<b>Tabla 2.</b> Resultados del ensayo fitoquímico	12
<b>Tabla 3.</b> Halos de inhibición de ensayo microbiológico en <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	13
<b>Tabla 4.</b> Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico	14
<b>Tabla 5.</b> Comparación de medias por el ANOVA	15
<b>Tabla 6.</b> Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey	17

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> <i>Semillas de Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	34
<b>Figura 2.</b> Selección de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	34
<b>Figura 3.</b> Procedimiento de lavado de la muestra de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	35
<b>Figura 4.</b> Procedimiento de secado de la muestra de las semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	36
<b>Figura 5.</b> Procedimiento de molienda de la muestra de las semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	37
<b>Figura 6.</b> Preparación del macerado del extracto etanólico de las semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	38
<b>Figura 7.</b> Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	38
<b>Figura 8.</b> Obtención del extracto seco de las semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	39
<b>Figura 9.</b> Esquema del proceso de preparación del medio de cultivo	46
<b>Figura 10.</b> Esquema de proceso de incubación	46
<b>Figura 11.</b> Lectura de resultados	47
<b>Figura 12.</b> Esquema de lectura de placas	48

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Materiales y métodos:** Investigación de tipo experimental, prospectivo, transversal, población de 20 kilos de frutos de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) y cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, por otro lado, la muestra estuvo constituida por 300g de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) y la muestra biológica usada fueron de 10 placas Petri. El procedimiento fitoquímico fue la marcha fitoquímica y el método microbiológico usado fue el de difusión en agar en pozos o Kirby Bauer modificado el cual requirió del uso de 10 repeticiones y estuvo constituida grupos al 25 %, 50 %, 75 % y 90 % frente al grupo control (Clorhexidina 0.12 %).

**Resultados:** Los metabolitos secundarios que se detectaron fueron los compuestos fenólicos, alcaloides, antocianinas y flavonoides. Mediante la prueba de ANOVA ( $p < 0,05$ ) y Tukey, se mostró como resultado diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales al 25 %, 50 %, 75% y 90% comparado con el Etanol 70° frente a *Streptococcus mutans*

**Conclusión:** El extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Palabras clave:** Efecto antibacteriano, *Opuntia soehrensii* Britton & Rose y *Streptococcus mutans*

## ABSTRACT

**Objective:** To determine the in vitro antibacterial effect of the ethanolic extract of *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) seeds against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 strains.

**Materials and methods:** Experimental, prospective, cross-sectional research, population of 20 kg of *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) fruits and *Streptococcus mutans* ATCC 25175 strain, on the other hand, the sample consisted of 300g of *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) seeds and the biological sample used were 10 Petri dishes. The phytochemical procedure was the phytochemical march and the microbiological method used was the diffusion method in disc agar or Kirby Bauer, which required the use of 10 replicates and consisted of groups at 25 %, 50 %, 75 % and 90 % versus the control group (Chlorhexidine 0.12 %).

**Results:** The secondary metabolites detected were phenolic compounds, alkaloids, anthocyanins and flavonoids. The ANOVA ( $p < 0.05$ ) and Tukey test showed a statistically significant difference between the experimental groups at 25%, 50%, 75% and 90% compared to ethanol 70° versus *Streptococcus mutans*.

**Conclusion:** The ethanolic extract of *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) seeds shows antibacterial activity against *Streptococcus mutans* ATCC 25175 strains.

**Key words:** Antibacterial effect, *Opuntia soehrensii* Britton & Rose and *Streptococcus mutans*.

## I. INTRODUCCIÓN

Las caries dental es una enfermedad que afecta a los dientes, su manifestación depende de una serie de factores, tales como las características de la saliva, la dieta que este llevando el individuo y la presencia de bacterias, entre la que destaca *Streptococcus mutans*, considerado el principal agente etiológico de esta enfermedad (1).

Dicho microorganismo se manifiesta en una gran parte de la población mundial, principalmente a niños, pero en los adultos también se puede hallar en asociación con otros patógenos bucales (2). En países como Irán un estudio realizado en 499 individuos halló que 77,6 % albergaba a esta bacteria y el 9,8 % la presentaba en asociación con otras especies bacterianas (3), en Brasil un estudio realizado en una institución preescolar, halló que el 29,6 % de los 27 niños que participaron presentaron mayor prevalencia de la bacteria (4), en Kosovo un estudio realizado en 66 mujeres embarazadas determinó que el 59,10 % tenían niveles altos de *Streptococcus mutans*, mientras que el 15,2 % niveles muy altos (5), por otro lado en India, halló que *Streptococcus mutans* tuvo mayor prevalencia frente a otras cepas con un 61,7 % de madres y en el 33,3 % de sus hijos (6), mientras que otros estudios en ese mismo país, encontró que el 42,5 % de 40 niños con diagnóstico de caries de la primera infancia severa presentaba a la bacteria, otros grupos como en niños con caries de la primera infancia conformado por 40 individuos tuvo una prevalencia del 27,5 % (7). Un estudio en Indonesia analizó la distribución de esta bacteria en 50 pacientes pediátricos, hallando que el 94 % de los pacientes lo presentaba (8), en Suecia el 46 % de 154 pacientes adolescentes tenían caries dentales causadas por *S. mutans* (9). En Perú la población más afectada es la pediátrica, ya que según algunas cifras indican que afecta al 75,6 % de niños (10).

La alta prevalencia desmedida de caries a causa de esta bacteria puede ocasionar consecuencias muy severas en la salud pública, diversos estudios indican que dicha bacteria ya presenta una alta resistencia contra antibióticos del grupo de las penicilinas y tetraciclinas (11), así como en productos que se utilizan principalmente para el manejo de cuidado bucal como la clorhexidina (12).

Es por ello que se requiere de nuevas alternativas en el tratamiento de caries ocasionadas por *Streptococcus mutans*, una de estas opciones es *Opuntia soehrensii* Britton & Rose, conocida como ayrampo, el cual es una planta con amplia distribución en nuestro país y que actualmente se está estudiando su eficaz efecto antibacteriano (13).

Ante lo mencionado anteriormente este estudio pretende evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las semillas de dicha especie vegetal frente a cepas de *Streptococcus mutans*, in vitro.

Presenta como problema General:

¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

*Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) pertenece a la familia de las Cactáceas y al género *Opuntia* (14), presenta una amplia distribución en los andes de nuestro país, principalmente en los departamentos de Ayacucho, Huancayo, Apurímac, Puno, etc. (15). Es un cactus que crece en suelos arenosos, calcáreos y poco fértiles, crece a una altura entre los 1700 a 3825 m.s.n.m; a pesar de ello no crece de manera adecuada en suelos arcillosos ni húmedos (16). En cuanto a sus beneficios medicinales, la semilla es muy utilizada debido a sus propiedades como laxante, febrífugo y tónico, las flores se consumen como infusión para evitar el cansancio y la anemia, y las hojas sirven como un relajante del sistema nervioso central (17). En su composición química se han hallado compuestos como flavonoides, taninos, carotenoides, ácido gálico, ácidos grasos, entre otros. La semilla es una gran fuente nutricional debido a su alto contenido de calcio, fósforo, magnesio y potasio (18). Una de sus principales propiedades la cual se está estudiando en la actualidad es su actividad antimicrobiana, la cual ha demostrado ser bactericida frente a bacterias gramnegativas como *Pseudomonas aeruginosa* y grampositivas contra especies del género *Staphylococcus* (19).

*Streptococcus mutans*, es una bacteria grampositiva que tiene forma de cadenas de cocos y que recibe su nombre debido a que puede cambiar de forma a bacilo

(20). Es el principal patógeno que produce caries debido a sus diversos factores de virulencia como su capacidad de metabolizar azúcares de la dieta en ácido láctico, lo que ocasiona un descenso del pH bucal y desmineralizando el esmalte bucal, por otro lado, puede producir glucanos y fructanos a partir de la sacarosa, los cuales le sirven para adherirse al diente y como fuente de nutrientes (21). Para su tratamiento se puede utilizar medicamentos en presentación líquida como clorhexidina, especialmente en pacientes crónicos que presenten esta bacteria, por otro lado, también se pueden utilizar antibióticos como amoxicilina (22).

Como antecedentes internacionales tenemos la investigación de El I. (2020), en la cual analizó la actividad antibacteriana del extracto de *Opuntia ficus indica* con diferentes solventes, como drogas vegetales se utilizaron la pulpa y cascara del fruto y la extracción se realizó utilizando solventes como acetona, etanol y metanol, el efecto antibacteriano se determinó mediante el método de difusión en disco. Como resultados se hallaron que los extractos preparados inhibieron el crecimiento de *Enterococcus faecium*, mientras que para *Streptococcus agalactiae*, el extracto de cascara (preparado con acetona al 80 %) fue más eficaz con un halo de  $10.83 \pm 0.29$  que el extracto a base de etanol con un halo de  $7.33 \pm 0.29$  mm (23).

En el estudio de Arbia L y *et al.* (2017), analizaron la capacidad antibacteriana de cuatro extractos acuosos de diferentes especies vegetales, una de ellas fue *Opuntia ficus-indica*, frente a bacterias bucales como *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, utilizando el método de difusión en disco. Como resultado con respecto al extracto de cladodios de *Opuntia ficus-indica* hallaron que este fue efectivo ante ambas cepas, pero mostró mayor inhibición en cepas de *Prevotella intermedia* con valores entre  $31,17 \pm 0,85$  y  $48,83 \pm 1,03$  mm (24).

Por último, el estudio de Fiad M y *et al.* (2020), evaluaron la capacidad antibacteriana del extracto de semillas de *Opuntia ficus-indica*, utilizando diferentes solventes como etanol, éter de petróleo y acetato de etilo. Para su procedimiento microbiológico utilizaron el método de difusión de disco de Kirby Bauer modificado contra cepas de *Bacillus subtilis* y *Serratia marcescens*. Como

resultados hallaron que el extracto etanólico demostró tener efecto antibacteriano al obtener un promedio 14.3 mm para la bacteria gramnegativa y 9.00 mm para la grampositiva (25).

Como antecedentes nacionales, la investigación de Aroni M (2018), en la cual determino el efecto antibacteriano del sinergismo de los extractos de hojas de ayrampo y guayaba frente a bacterias grampositivas, para ello utilizaron la metodología de difusión de disco según Kirby Bauer. Como resultados se halló que el extracto de guayaba no presento halos de inhibición en el crecimiento de ambas bacterias, mientras que ambos extractos tampoco presentaron efecto antibacteriano en sinergismo, ya que sus halos fueron de 8.7 mm para *S. aureus* y 11.7 mm para *L. monocytogenes* (26).

En la tesis de Diaz C y Llontop K (2021), evaluaron la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de cladodio de *Opuntia ficus-indica* contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureginosa*, según la metodología de Kirby Bauer, las concentraciones del extracto a utilizar fueron 25, 50 y 100 mg/mL. Como resultado se obtuvo que el extracto de 100 mg/mL tuvo valores de halos de 19 y 24 mm, al igual que la concentración de 50 mg/mL con valores de 13 y 18 mm, para cada bacteria respectivamente (27).

Finalmente, el estudio de Nattes P y Quispe Z (2018), elaboraron un gel desinfectante a base del extracto etanólico de las semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) y evaluar su capacidad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, basado en la técnica de Kirby Bauer, además también se determinó la presencia de ciertos grupos de fitoconstituyentes. Como resultado se halló la presencia principalmente de fenoles. Por otro lado, el extracto preparado presento efecto antibacteriano contra *E. coli* con un halo de 35.8 mm y 27. 2 mm para *S. aureus*, finalmente el gel tuvo el efecto esperado (28).

La justificación en el ámbito teórico pretende aportar con datos científicos sobre eficacia antibacteriana que presenta el extracto etanólico de las semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, así como información útil sobre la fitoquímica de dicha

especie vegetal en estudio mediante el reconocimiento de diferentes grupos de metabolitos primarios y secundarios. De manera practica estos resultados servirán para incentivar la investigación de las propiedades antibacterianas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose y además se promulgará el uso de esta, como un tratamiento alternativo eficaz contra la principal infección que produce esta bacteria como son la caries dental, esto ayudara a disminuir la prevalencia de esta, así como los casos de resistencia que ya se han reportado. Finalmente, a nivel metodológico, las técnicas utilizadas en los procedimientos fitoquímicos y microbiológicos son eficaces y los resultados serán validados mediante el uso de estadística descriptiva.

Presenta como objetivo general:

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Presenta como hipótesis general:

El extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## II. MATERIALES Y METODOS

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

Cuantitativa porque los datos se analizaron en base a técnicas numéricas (29).

**Experimental:** por lo que se manipulo las variables independiente y dependiente (30).

**Prospectivo:** Debido a que la recolección de los datos fueron del presente en adelante (31).

**Transversal:** Debido a que la recolección de los datos se realizó en un momento y tiempo determinado (32)

### II.2. Población, Muestra y Muestreo

#### Población:

- **Vegetal:** Se consideró 20 kilos de frutos de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo), departamento de Puno, provincia de San Ramón y distrito de Caracoto -Cachigrande, a 3825 m s. n. m. con coordenadas 15°34'09"S 70°06'26"O.



- **Biológica:** Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

**Muestra:**

- **Vegetal:** Constituida por 300g de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo).
- **Biológica:** 10 placas Petri con agar Mueller Hinton.

**Criterios de inclusión:**

- Frutos sin daños físicos
- Frutos maduros

**Criterios de exclusión:**

- Frutos en estado de descomposición

**II.3. Variables de investigación.**

**Variable independiente:** Extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo)

- **Definición conceptual:** Fracción líquida obtenida por maceración etanólica, extraído de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (26).
- **Definición operacional:** Se realizó una maceración de las semillas de la especie vegetal *Opuntia soehrensii* Britton & Rose.

**Variable dependiente:** Efecto antibacteriano in vitro.

- **Definición conceptual:** Propiedad de una sustancia para inhibir y/o eliminar el crecimiento de una bacteria (28).
- **Definición operacional:** Se inoculó placas petri con las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y se expondrán las sustancias experimentales.

**II.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos**

La técnica que se usó fue la observación a través de procedimientos de laboratorio en el ámbito fitoquímico y microbiológico.

El instrumento fue la ficha de observación.

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

### **II.5.1. Recolección de la muestra vegetal.**

El fruto de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) fue recolectado en el departamento de Puno, provincia de San Ramón y distrito de Caracoto - Cachigrande, tomando los criterios de inclusión y exclusión.

### **II.5.2. Identificación de la muestra vegetal.**

La identificación de la muestra vegetal de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) se realizó a través de un biólogo especialista en taxonomía.

### **II.5.3. Preparación de material vegetal**

Se procedió con la selección de frutos en buen estado, quitado zonas afectadas con hongos e insectos, luego se procedió a quitar la parte del epicarpio (cáscara) separando las semillas del mesocarpio (pulpa), el cual se lavó con agua destilada. Por otro lado, estas semillas se secaron a estufa a temperatura constante de 40°C. Finalmente, las semillas deshidratadas fueron reducidas de tamaño en un mortero.

### **II.5.4. Preparación del extracto seco hidroalcohólico**

La preparación de la extracción por maceración siguió la técnica propuesta por (Bonatti, 1991). Se procedió a realizar el pesado de las semillas trituradas, para ello se utilizó 300g de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) junto con etanol al 70 % y se colocaron en un frasco ámbar. La maceración se realizó por 7 días, agitando dos veces al día. Al finalizar el proceso, el extracto se filtró con papel filtro whatman N° 1 y se llevó a una temperatura de 37 °C para obtener el extracto seco (33).

### **II.5.5. Análisis cualitativo de semillas de *Opuntia soherensii* Britton & Rose (Ayrampo)**

**Prueba de solubilidad:** Siguió el método Olga Lock. Para conocer la afinidad del extracto seco, se utilizó 0,5 g del extracto que fueron agregados a 0,5 mL de diferentes solventes como etanol, butanol, metanol, cloroformo, agua destilada, éter de petróleo y diclorometano.

**Marcha fitoquímica del extracto:** Para realizar el tamizaje fitoquímico se utilizó 1 mL de extracto fluido en cada uno de los 14 tubos de ensayo, según el método Olga Lock. Los reactivos utilizados fueron Baljet (Lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturadas), Dragendorff (Alcaloides), Gelatina-sal (Taninos), Benedict y Fehling A/B (Azúcares reductores), NaOH 10 % (Antocianinas), Cloruro férrico (Compuestos fenólicos), Shinoda (Flavonoides), Liebermann-Burchard (Triterpenos y esteroides), Gelatina (Taninos), Wagner (Alcaloides), Índice Afro simétrico (Saponinas), Borntrager (Quinonas) y Mayer (Alcaloides).

#### **II.5.6. Actividad antibacteriana del extracto seco de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) según el método por difusión en agar en pozo o Kirbi bauer modificado.**

La activación de la cepa se realizó según las instrucciones del fabricante, luego se utilizó un hisopo estéril para sembrar en agar sangre, por ultimo el cultivo se llevó a 37°C por 24 horas.

La inoculación de las cepas se realizó en agar Mueller Hinton enriquecido con sangre, pero previamente se realizó el ajuste de la suspensión bacteriana comparándolo con la escala 0,5 de Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/ml). Finalmente se realizaron pozos de 6 mm de diámetro con el uso de un sacabocado en los que se depositó 20  $\mu$ L de los siguientes grupos:

- Grupo experimental 1: Extracto de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) 25 %
- Grupo experimental 2: Extracto de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) 50 %
- Grupo experimental 3: Extracto de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) 75 %

- Grupo experimental 3: Extracto de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) 90 %
- Grupo control: Clorhexidina 0.12%
- Grupo control: Etanol 70°

Como ultimo paso las placas se incubaron a 37 °C de 24 a 48 horas, para posteriormente medir los halos de inhibición.

## **II.6. Métodos de análisis estadístico**

Los datos registrados de las pruebas fueron analizados en un software estadístico denominado (SPSS), se procedió a realizar estadística descriptiva y estadística inferencial para el contraste de hipótesis, por medio del estadístico ANOVA y test de Tukey, todo esto representado mediante tablas y gráficos.

## **II.7. Aspectos éticos**

El presente estudio por ser de carácter experimental de tipo microbiológico utilizó protocolos de bioseguridad, procedimientos adecuados de eliminación de bio contaminantes y productos químicos. Por otro lado, la información presentada en la presente investigación cumplió con los criterios de citas de toda la información considerada, cumpliendo con aspectos de similitud bajo el programa Turnitin. Finalmente, los investigadores declararon no tener algún conflicto de interés y se sometieron a las sanciones del comité de ética de la Universidad María Auxiliadora, por información no fidedigna (34,35).

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Prueba de Solubilidad

**Tabla 1.** Ensayo de solubilidad

<b>TUBO</b>	<b>SOLVENTE</b>	<b>RESULTADOS</b>
N° 1	Éter de petróleo	-
N° 2	Diclorometano	-
N° 3	Cloroformo	-
N° 4	Butanol	-
N° 5	Etanol 96°	-
N° 6	Etanol 70°	+++
N° 7	Metanol	+
N° 8	Agua destilada	+

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

El extracto en estudio presentó afinidad muy soluble por el solvente etanol 70°, poca solubilidad en metanol y agua destilada, por otro lado, no presentó solubilidad por los solventes apolares.

### 3.2. Tamizaje fitoquímico

**Tabla 2.** Resultados del ensayo fitoquímico

<b>TUBO</b>	<b>ENSAYOS</b>	<b>METABOLITO</b>	<b>RESULTADO</b>
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

La marcha fitoquímica demostró la abundante presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, antocianinas y flavonoides, de igual importancia presentó la mínima presencia de antraquinonas, terpenos y esteroides, lactonas  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturadas, taninos y saponinas.

### 3.3. Ensayo microbiológico

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

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	90%	75 %	50 %	25 %	Clorhexidin a 0.12%	Etanol 70°
<b><i>Streptococcus mutans</i></b> <b>ATCC 25175</b>	10.25	9.14	7.73	6	18.25	6
	10.28	9.15	7.72	6	18.23	6
	10.27	9.13	7.75	6	18.20	6
	10.25	9.14	7.70	6	18.21	6
	10.29	9.10	7.74	6	18.20	6
	10.25	9.13	7.74	6	18.21	6
	10.26	9.10	7.76	6	18.25	6
	10.24	9.14	7.72	6	18.23	6
	10.28	9.13	7.73	6	18.21	6
	10.29	9.15	7.74	6	18.20	6
<b>Media</b>	10.27	9.13	7.73	6	18.22	6

*mutans* ATCC 25175

Los resultados microbiológicos que la clorhexidina 0.12% obtuvo un halo de 18.22 mm. Por otro lado, los extractos al 50 %, 75 % y 90 % evidenciaron un halo inhibición medio de 7.73 mm, 9.13 mm. y 10.27 mm respectivamente.

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

<b>Estadísticos</b>		
<b>Grupo</b>		
<b>N</b>	Válido	60
	Perdidos	0
Media		3,50
Error estándar de la media		,222
Mediana		3,50
Moda		1 <sup>a</sup>
Desv. Desviación		1,722
Varianza		2,966
Asimetría		,000
Error estándar de asimetría		,309
Curtosis		-1,274
Error estándar de curtosis		,608
Rango		5
Mínimo		1
Máximo		6
Suma		210
a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.		

Los resultados descriptivos ensayo microbiológico, muestran la representación de los datos a nivel de medidas de tendencia central, de dispersión y datos descriptivos complementarios.

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

<b>ANOVA</b>					
<b><i>Streptococcus mutans</i></b>					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	<b>Sig.</b>
<b>Entre grupos</b>	1043,459	5	208,692	936770,874	<b>,000</b>
<b>Dentro de grupos</b>	,012	54	,000		
<b>Total</b>	<b>1043,471</b>	<b>59</b>			

En la tabla 5 el análisis de varianzas (ANOVA), muestra un valor menor a 0.05. Esto representa que existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales.

El test de Tukey evaluó las diferencias entre los grupos experimentales. La tabla 6 indica que existe diferencia significativa entre los grupos al 25, 50, 75 y 90 % frente al control positivo y negativo ( $p < 0.005$ ). Sin embargo, el grupo al 25 % no presenta diferencia significativa en comparación al control negativo ( $p > 0.005$ ).

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

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: <i>Streptococcus mutans</i>						
HSD Tukey						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Clorhexidina 0.12 %	Etanol 70°	12,21900*	,00667	,000	12,1993	12,2387
	25 %	12,21900*	,00667	,000	12,1993	12,2387
	50 %	10,48600*	,00667	,000	10,4663	10,5057
	75 %	9,08800*	,00667	,000	9,0683	9,1077
	90 %	7,95300*	,00667	,000	7,9333	7,9727
Etanol 70°	Clorhexidina 0.12 %	-12,21900*	,00667	,000	-12,2387	-12,1993
	25 %	,00000	,00667	1,000	-,0197	,0197
	50 %	-1,73300*	,00667	,000	-1,7527	-1,7133
	75 %	-3,13100*	,00667	,000	-3,1507	-3,1113
	90 %	-4,26600*	,00667	,000	-4,2857	-4,2463

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

## IV. DISCUSIÓN

### IV.1 Discusiones

En la prueba de solubilidad, los resultados mostraron afinidad de carácter muy soluble para etanol de 70°, poca solubilidad en metanol y agua destilada y no soluble por los solventes apolares. Esto se debe a la interacción del grupo hidroxilo del alcohol y los hidrógenos del agua que se unen mediante enlaces puentes de hidrogeno, asimismo hay un cambio del pH debido a que el pH del 100% de etanol es de 7,33, en comparación con el pH de 7,00 del agua pura, y esto es motivo de la diferencia de solubilidad del etanol de 96° y el etanol del 70° frente a la muestra en investigación (36). En el tamizaje fitoquímico se identificaron principalmente compuestos fenólicos, alcaloides, antocianinas y flavonoides, los cuales sean responsables de la capacidad antibacteriana (37). Estos resultados coinciden con los resultados de Llorona (2019) el cual en su investigación sobre la actividad biológica de las semillas de ayrampo, fueron los taninos y flavonoides responsables de la actividad biológica (38). También con el estudio de Nattes P y Quispe Z (2018), quienes identificaron fenoles, taninos, flavonoides, alcaloides en las semillas de ayrampo (28). Hay tres mecanismos compuestos antibacterianos de flavonoides, a saber, inhibiendo la síntesis de ácido nucleico, inhibiendo la función de la membrana citoplasmática e inhibiendo el metabolismo energético de las bacterias. Los flavonoides pueden inhibir la síntesis de ácidos nucleicos de las bacterias a través del anillo del grupo B que se sospecha tiene un papel en el proceso de intercalación del ADN, o a través de enlaces de hidrógeno con la disposición básica de los ácidos nucleicos de las bacterias que inhibirán la síntesis de ADN o ARN. Además, los flavonoides también tienen la capacidad de interferir con la actividad de la transpeptidasa peptidoglicano de modo que se altera la formación de la pared celular. Como resultado, la célula bacteriana no puede soportar la presión osmótica interna entre 5 y 20 atmosféricos, donde la presión es suficiente para romper las células si se destruyen las paredes celulares (39).

En el ensayo microbiológico se evidenció que las concentraciones al 50 %, 75 % y 90 % del extracto mostraron halos de inhibición de 7.73; 9.13 y 10.27 mm respectivamente. Pero la concentración al 25 % no presentó resultados significativos. Además, se evidenciaron diferencia estadísticamente significativa

( $p < 0.05$ ) en los todos los grupos por la prueba estadística de ANOVA y solo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) para los grupos al 50 %, 75 % y 90 % según Tukey. A pesar de los resultados informados, estos difieren con los obtenidos por de Aroni M (2018), quien no obtuvo resultados óptimos cuando evaluó el efecto sinérgico de los extractos de Ayrampo y guayaba frente a bacterias grampositivas (26). Por otro lado, coincide con lo obtenido por Diaz C y Llontop K (2021), quienes evaluaron el efecto antibacteriano de *Opuntia ficus-indica* frente a bacterias grampositivas y gramnegativas (27). Así como con la investigación de Arbia L y et al. (2017), por analizar la capacidad antibacteriana de *Opuntia ficus-indica*, frente a bacterias bucales como *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*, obteniendo halos de inhibición de  $31,17 \pm 0,85$  y  $48,83 \pm 1,03$  mm respectivamente que corresponde a una actividad beneficiosa (24).

El extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) al 25 %, 50 %, 75 % y 90 % comparado con la Clorhexidina 0.12% frente a cepas biológicas como el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 no superaron el efecto inhibitor, estos resultados son similares al estudio de Nattes P y Quispe Z (2018) quienes evidenciaron que los discos con extracto acuoso de *Opuntia soehrensii* no superaron el efecto inhibitor del disco control a base de Ceftriaxona 30 $\mu$ g frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. (28) Debido a las similitudes de la presencia de alcaloides en las diferentes investigaciones mostradas en párrafos anteriores, se indica que el mecanismo del alcaloide es que interfiere con el peptidoglicano que permite la constitución de los componentes de la célula bacteriana, por lo que las capas de la pared celular no se forman completamente y provocan la muerte de estas células. En los alcaloides, también hay un grupo de base nitrogenada que reacciona con los compuestos de aminoácidos que forman las paredes celulares de las bacterias y el ADN bacteriano. Esta reacción da como resultado cambios en la estructura y composición de los aminoácidos, lo que conduce a cambios en el equilibrio genético en la cadena de ADN; por lo tanto, la célula se daña y promueve la lisis de la célula bacteriana, provocando la muerte de las células bacterianas (40).

## IV.2 Conclusiones

- 1) El extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- 2) El extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) presenta compuestos fenólicos, alcaloides, antocianinas y flavonoides.
- 3) El extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) a la concentración del 75 % y 90 % poseen efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- 4) El extracto etanólico de semillas de *Opuntia soehrensii* Britton & Rose (Ayrampo) al 25 %, 50 %, 75 % y 90 % no superan el efecto inhibidor comparado con la Clorhexidina 0.12% frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### **IV.3 Recomendaciones**

- Realizar investigaciones utilizando las semillas de Ayrampo frente a otros microorganismos tales como hongos, parásitos, etc.
- Fomentar el uso tradicional de las semillas de Ayrampo en la población nacional para coadyuvar en procesos infecciosos.
- Efectuar investigaciones en el ámbito farmacológico con las semillas y mesocarpio.
- Ejecutar estudios con la penca, flor y espina de Ayrampo para comprobar su capacidad antimicrobiana.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al Mahmood S, Al Kaisy A, Mahmood M, Aldhafer Z, Sabri A. The Prevalence of Streptococcus Mutans with Different ABO Blood Groups Among Healthy College Students Sumayah. *Open Dent J.* 2020;14(1):45–51.
2. Zubaidah N, Dianawati N, Ridwan R, Shirakawa T. The Clinical Pattern and Prevalence of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus among Adult and Children Patients with Dental Caries. *Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr* [Internet]. 2022;22:1–11. Available from: <https://www.scielo.br/j/pboci/a/7yGVtFFKgbm4YfBjN7LfHLF/>
3. Babaeekhou L, Ghane M, Ezatzade F, Eftekhari S. Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus distribution in the saliva and plaque of Iranian population: Higher prevalence of S. mutans serotypes f and k. *Int J Dent Hyg* [Internet]. 2021;19(2):193–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33369141/>
4. Argandoña R, Duque C, Sampaio K, et al. Genotypic diversity and phenotypic traits of Streptococcus mutans isolates and their relation to severity of early childhood caries. *BMC Oral Health.* 2017;17(1):1–9.
5. Behluli E, Dragidella F, et al. Comparative study of Streptococcus mutans in pregnant women's saliva in the first and third trimesters. *J Int Dent Med Res* [Internet]. 2021;14(1):280–5. Available from: <https://www.proquest.com/openview/0710c16c8461821edc1538899b9f4c2e/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1036416>
6. Subramaniam P, Suresh R. Streptococcus mutans strains in mother-child pairs of children with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent.* 2019;43(4):252–6.
7. Veena R, Nagarathna C. Correlation of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus colonization with and without caries experience in preschool children. *Indian J Dent Res.* 2020;31(1):73–9.
8. Dianawati N, Setyarini W, Widjiastuti I, Ridwan RD, Kuntaman K. The distribution of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in children

- with dental caries severity level. *Dent J (Majalah Kedokt Gigi)*. 2020;53(1):36–9.
9. Eriksson L, Lif Holgerson P, Esberg A, Johansson I. Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 2018;97(3):275–82.
  10. Delgadillo J, Espinoza S, Campodonico C, et al. Presencia de *Streptococcus Mutans* Genotipo C en niños y adolescentes peruanos con caries. *Odovtos Int J Dent Sci*. 2018;20(3):121–9.
  11. Haque M, Sartelli M, Haque SZ. Dental infection and resistance-global health consequences. *Dent J*. 2019;7(1):1–19.
  12. Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria-is there cause for concern? *Front Microbiol*. 2019;10:1–11.
  13. Villar C, Cusi E. Evaluacion de la capacidad antioxidante y fotoprotectora in vitro de la crema gel elaborada con extracto acuoso de la cascara de la variedad amarilla del fruto de *Opuntia soehrensii* B. (ayrampo). Universidad Maria Auxiliadora; 2020.
  14. Apaza AG. Influencia de parametros fisicoquimicos en la extraccion de pigmentos de ayrampo (*Opuntia soehrensii* B.), sobre el contenido de fenoles totales , betacianinas totales y capacidad antioxidante. Universidad Nacional de Moquegua; 2017.
  15. Merino JC, Perez KR. Efecto antihipertensivo del extracto hidroalcohólico de la semilla de Tunilla *soehrensii* Brito & Rose (airampo) con induccion en ratas albinas. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
  16. Justo R. Obtencion de extracto colorante por maceracion a partir de las semillas de ayrampo (*Opuntia soehrensii*) procedentes de la provincia de Candarave. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2018.
  17. Quispe V. Sustitucion del colorante carmin por un colorante natural a base de ayrampo (*Opuntia soehrensii*) en la elaboracion de salame. Universidad Le Cordon Bleu; 2019.

18. Cupido M. Analisis por GC-MS de compuestos fitoquimicos en *Opuntia megarrhiza* (cactacea) una especie mexicana en peligro de extincion. Universidad Autonoma de San Luis Potosi; 2021.
19. Briones Z, Mendez R, Reyes C, Lazalde B. Determinación del efecto antibacteriano y antimicótico del extracto etanólico de mucílago de nopal. *Acta Biochim Clin Latinoam*. 2018;52(1):201–11.
20. Machado T, Reyes B. *Streptococcus mutans*, principal cariogénico de la cavidad bucal. *Progaleno*. 2021;4(3).
21. Cueva J. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro. Lima 2016. Universidad Privada Norbert Wiener; 2017.
22. Ayesta A, Guevara K. Relacion entre el nivel de colonizacion de *Streptococcus mutans* en niños de 0 a 36 meses y sus madres, en el centro de salud Cerropon de las Brisas en la provincia de Chiclayo-2017. Universidad Catolica Santo Toribio de Mogrovejo; 2018.
23. El I. Effect of extraction solvent on phenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of skin and pulp of Tunisian red and yellow–orange *Opuntia Ficus Indica* fruits. *J Food Meas Charact*. 2021;15(1):643–51.
24. Arbia L, Chikhi-Chorfi N, Betatache I, Pham-Huy C, Zenia S, Mameri N, et al. Antimicrobial activity of aqueous extracts from four plants on bacterial isolates from periodontitis patients. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24(15):13394–404.
25. Fiad M, El-Masry R, Gomaa A, Awad A. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Opuntia ficus indica*, seeds and peels extracts. *Zagazig J Agric Res*. 2020;47(2):587–96.
26. Aroni M. Sinergismo antimicrobiano de los extractos etanolicos del *Opuntia soherensii* (ayrampo) y *Psidium guajava* L (guayaba) frente a *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Universidad Alas Peruanas; 2018.
27. Diaz C, Llontop K. Efecto in vitro del extracto etanolic del cladodio de *Opuntia ficus indica* en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aureginosa*. Universidad Nacional de Trujillo; 2021.

28. Nattes P, Quispe Z. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de ayrampu(*Opuntia soehrensii*) para el desarrollo galénico de un gel de limpieza de manos. Universidad Mayor de San Andres; 2018.
29. Carmelo V. Metodología de la investigación biomédica: Fundamentos. 1st ed. Buenos Aires: Webmastering; 2016. 249 p.
30. Cegarra J. Metodología de la investigación científica y tecnológica. 1st ed. Madrid: Diaz de Santos; 2004. 372 p.
31. Hernandez R, Mendoza C. Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. 1st ed. Mexico: Mc Graw Hill; 2018. 751 p.
32. Amiel J. Metodología y diseño de la investigación científica. 1st ed. Ruiz M, editor. Lima: Fondo editorial de la Universidad Científica del Sur; 2014. 1–329 p.
33. Rivas C, Oranday M, Verde M. Investigación en plantas de importancia médica. OmniaScien. Mexico; 2016. 1–453 p.
34. Oficina ejecutiva de investigación. Manual de procedimientos de ensayos clínicos. N° 279-2017-J-OPE/INS Perú: Ministerio de salud; 2017 p. 118.
35. Brítez J. La Ética en investigaciones humanas y el Comité de Ética. Rev virtual Soc Parag Med Int. 2016;3(1):8–10.
36. Sohrevard N. Structure properties of mixtures composed of ethanol and water by molecular dynamics simulation. Iran J Org Chem. 2021;13(1):3005–14.
37. Juniarti, Devi Kusumaningsih T, Setyari W, Soetojo A, Dara N. Phytochemical Analysis and Antibacterial Activity of Purple Leaf Extract [*Graptophyllum pictum* (L.) Griff] Against *Streptococcus mutans*. Acta Med Philipp. 2021;55(8):1–13.
38. Llorona R. Efecto cicatrizante de la crema del extracto hidroalcohólico del fruto de Ayrampo (*Opuntia soehrensii*) por inducción experimental ratas albinas (holtzman). Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
39. Corvianindya Y, Sabir A, Setyorini D. Antibacterial activity of red dragon fruit extract (*hylocereuspolyrhizus*) on *streptococcusmutans*. Int J App Pharm. 2019;11(4):60–3.

40. Dharmautama M, Tetelepta R, Ikbal M, Warti A. Effect of mangrove leaves extract (*avicennia marina*) concentration on the growth of *streptococcus mutans* and *candida albicans*. *J Dentomaxillofac Sci.* 2017;2(1):155–69.

## **ANEXOS**

## ANEXO A. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	N° DE ÍTEMS	VALOR
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b> Extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	Fracción líquida obtenida por maceración etanólica, extraído de las semillas de la especie vegetal <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	Se realizará una maceración de las semillas de la especie vegetal <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo)	Fitoquímica	Pruebas de solubilidad  Marcha fitoquímica	Ordinal	14	(-) Ausente (+) Escaso (++) Leve (+++) Moderado (++++) Abundante
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b> Efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Es la capacidad de una sustancia para inhibir y/o eliminar el crecimiento de una bacteria	Se inocularán placas petri con las cepas bacterianas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y se expondrán las sustancias experimentales.	Microbiológico	Medición de diámetro inhibición (mm)	Razón	10	<8 mm: nulo 8 – 14 mm: Sensible 14 – 20 mm: Muy sensible >20 mm: Sumamente sensible

**ANEXO B. Instrumento de recolección de datos.**

**ENSAYO ANTIBACTERIANO IN VITRO**

**Investigador(es):**

**Muestra:**

N°	Frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175					
	Etanol 70°	Clorhexidina 0.12%	Ext 25 %	Ext 50 %	Ext 75 %	Ext 90 %
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						

**Tabla B: Marcha fitoquímica del extracto etanólico**

<b>IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS</b>		
<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Resultado</b>
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	
Azucares Reductores	Benedict	
Azucares Reductores	Fehling	
Saponinas	Espuma	

**Donde:**

- (-) Ausente
- (+) Escaso
- (++) Leve
- (+++ Moderado
- (++++ Abundante

### ANEXO C. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
<b>Problema General</b>	<b>Objetivo General</b>	<b>Hipótesis General</b>
¿Cuál es el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo) frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?	Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo) frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	El extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton & Rose (Ayrampo) presenta efecto antibacteriano <i>in vitro</i> sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175
<b>Problemas Específicos</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>Hipótesis Específicas</b>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ¿Qué metabolitos secundarios posee el extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) responsables del efecto antibacteriano <i>in vitro</i>?</li> <li>2. ¿Cuál es la concentración del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) que posee efecto antibacteriano <i>in vitro</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?</li> <li>3. ¿Cuál es el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) comparado con clorhexidina sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) responsables del efecto antibacteriano <i>in vitro</i>.</li> <li>2. Determinar la concentración del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) que posee efecto antibacteriano <i>in vitro</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</li> <li>3. Comparar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) con clorhexidina sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. El extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) tiene metabolitos secundarios responsables del efecto antibacteriano <i>in vitro</i>.</li> <li>2. Existe una concentración del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) que posee efecto antibacteriano <i>in vitro</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</li> <li>3. La actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de semillas de <i>Opuntia soehrensii</i> Britton &amp; Rose (Ayrampo) es significativamente mayor comparado con clorhexidina sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</li> </ol>

## ANEXO A. Informe de laboratorio



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

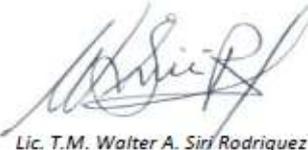
### Informe de Resultados

Solicitado por: Palacios Rosales, Mary Cruz  
Coila Colquehuanca, Rosio Obdulia  
Muestra: Extracto de semillas de ayrampo  
Cantidad: 9.10 gr  
Fecha de ensayo: 18-06-2022

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm					
	90%	75%	50%	25%	Clorhexidina 0.12%	Etanol 70°
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	10.25	9.14	7.73	6	18.25	6
	10.28	9.15	7.72	6	18.23	6
	10.27	9.13	7.75	6	18.20	6
	10.25	9.14	7.70	6	18.21	6
	10.29	9.10	7.74	6	18.20	6
	10.25	9.13	7.74	6	18.21	6
	10.26	9.10	7.76	6	18.25	6
	10.24	9.14	7.72	6	18.23	6
	10.28	9.13	7.73	6	18.21	6
	10.29	9.15	7.74	6	18.20	6

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

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



Lic. T.M. Walter A. Siri Rodriguez  
CTMP. 10808

---

Jr. Comercio N° 597 Pachacámac Telf. 2311053 Cel. 941708196- 993446913

## ANEXO B. Certificado Taxonómico



# CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO, CBP 3796 - INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORIAL N.º 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

### CERTIFICA:

Que, las bachilleres **PALACIOS ROSALES, MARY CRUZ y COILA COLQUEHUANCA, ROSIO OBDULIA**. Tesistas de la Universidad Maria Auxiliadora. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, para desarrollar el proyecto de tesis titulado: EFECTO ANTIBACTERIANO in vitro DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Opuntia soehrensii* (AYRAMPO) FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175. han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta silvestre procedente de la zona de Cachigrande, distrito Caracoto, provincia San Ramón, departamento de Puno, donde es conocida con el nombre vulgar de "ayrampo"; la muestra ha sido estudiada y se identificó que corresponde a la especie *Tunilla soehrensii* (Britton & Rose) D.R. Hunt & Iliff. Según la base de W<sup>3</sup>Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), la especie identificada se ubican en las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Caryophyllanae

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Género: *Tunilla*

Especie: *Tunilla soehrensii* (Britton & Rose) D.R. Hunt & Iliff.

Sinónimo: *Opuntia soehrensii* Britton & Rose

Se expide la presente certificación botánica para fines de investigación científica.

Lima, 22 de octubre del 2022



Jr. Sánchez Silva 156 – Piso 2–Urb. Santa Luzmila –Lima 07 -Lima

## ANEXO C. Evidencias de campo

### Muestra:

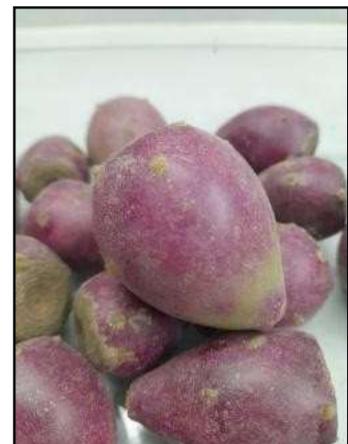
- Semillas de ayrampo
1. Recepción de muestra
    - Fecha : 06-06-22
    - Peso recibido : 409.8 g semillas
  2. Tratamiento y extracción de la droga vegetal

#### 2.1 Tratamiento de la droga vegetal

Con el fin de adecuar la muestra para el posterior proceso de preparación del extracto hidroalcohólico, se realizaron las siguientes operaciones previas:

##### a. Selección y Limpieza

Se eliminó cuidadosamente la tierra que pudiera estar adherida sobre la superficie del fruto, así como aquellos que estuvieran en mal estado o con signos de contaminación microbiana.



**Frutos seleccionados en buen estado**

b. Lavado y extracción de semillas

Con este proceso se eliminó todos los vestigios de tierra que pudieran haber quedado sobre la superficie del fruto aplicando un flujo continuo de agua potable a temperatura ambiente y empleando una escobilla suave, por último se enjuagó con agua destilada y se dejó escurrir para eliminar exceso de humedad.

A continuación se procedió a cortar y separar la cáscara de la pulpa; por último con ayuda de un colador se separaron las semillas.



Lavado con agua potable



Lavado con agua destilada



Extracción de pulpa



Extracción de semillas

### c. Secado

Este proceso consiste en eliminar gran parte del agua de la especie. Esto debido a que la presencia de agua es el principal responsable de la alteración de la planta recolectada. Al disminuir la cantidad de agua, las enzimas detienen su actividad, quedan inhibidas y la planta se conserva. Así mismo facilita el proceso de extracción.

En este caso la muestra fue distribuida sobre bandejas de pyrex y secada por 48 horas en una estufa con aire recirculante a una temperatura de 40 °C.

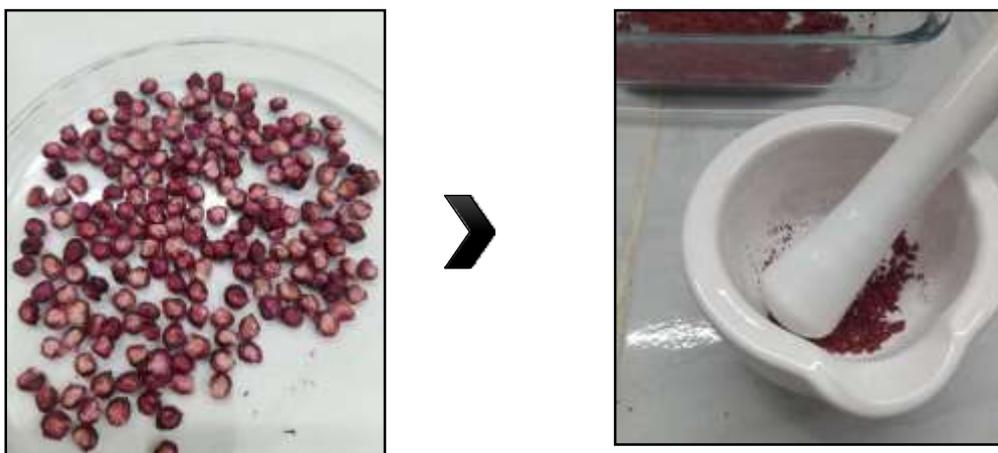
- Tiempo de secado: 48 horas
- Temperatura de secado: 40 °C
- Peso obtenido luego de proceso: 318.3 g



#### d. Molienda

La muestra una vez seca, fue sometida a trituración mecánica empleando un mortero y pilón de porcelana, con la finalidad de reducir el tamaño de partículas y aumentar el número de las mismas para de esta manera hacer más eficiente el proceso de extracción al incrementar la superficie de contacto.

- Peso obtenido luego de molienda: 318.1 g



Proceso de molienda

### 2.2 Extracción

#### a. Macerado

El proceso de extracción se realizó macerando, dentro de un frasco ámbar, el material obtenido luego de la molienda con alcohol de 70°. El proceso de maceración se realizó durante 7 días, sometiéndolo a agitación mecánica diaria.

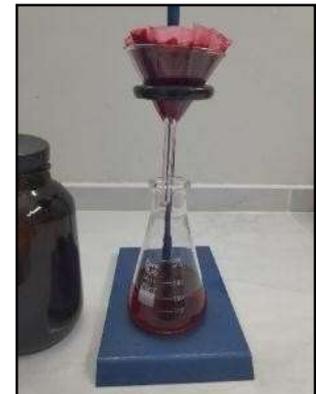
- Cantidad de muestra: 300 g
- Solvente: etanol al 70°
- Cantidad de solvente: 450 ml
- Días de macerado: 7 días



Proceso de maceración

b. Filtrado

El líquido resultante del proceso de maceración fue filtrado empleando papel de filtro whatman N°1 y un embudo.



c. Obtención extracto seco

Para facilitar la evaporación del disolvente, el líquido filtrado fue vertido sobre placas petri de vidrio y fue llevado a estufa de aire recirculante a una temperatura de 40°C hasta sequedad.

- Cantidad líquido a secar: 350 mlvv
- Temperatura: 40°C
- Tiempo de secado: 48 horas
- Cantidad extracto obtenido: 9.10 g.



# INFORME ENSAYO MICROBIOLÓGICO

## I. MÉTODO

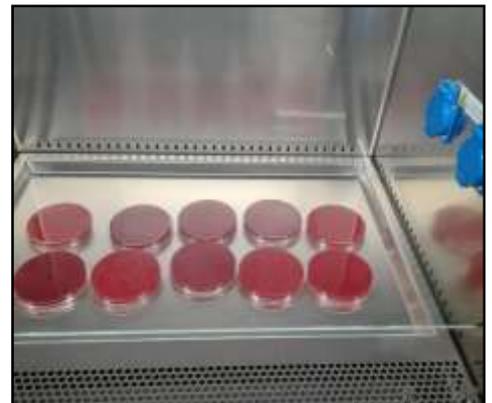
Método de difusión en pozos (Kirby Bauer modificado)

Consiste en depositar dentro de pozos elaborados sobre la superficie de una placa con agar previamente inoculada con el microorganismo, diferentes sustancias a evaluar.

### 1. Preparación de Medio de Cultivo

#### 1.1 Agar Mueller Hinton con 5% de sangre de carnero

- El medio de cultivo fue preparado partiendo de la base deshidratada y siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.
- Se pesó 7.6 gr. de la base deshidratada y se adicionó 200 ml de agua destilada, a continuación, se procedió a calentar con agitación frecuente hasta lograr la disolución total del medio de cultivo, por último, se esterilizó en autoclave sometiéndolo a 15 libras de presión (121°C) durante 15 minutos.
- Una vez terminado el proceso en la autoclave, se dejó enfriar hasta que el medio de cultivo alcanzó una temperatura entre 45°C – 50°C para agregar posteriormente 5% de sangre bovina estéril al medio fundido y estéril.
- Una vez adicionada la sangre se homogenizó el medio de cultivo y se distribuyó en placas petri estériles de 90 x 15 mm.



## 2. Activación de la cepa: Kwik-stik microbiologics - *Streptococcus mutans*

Para preparar el inóculo se empleó el producto Kwik-stik microbiologics® que contiene a la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en un pelet.

- a. El Kwik-stik tiene en la parte superior una ampolla con líquido hidratante, el cual fue liberado al apretar una sola vez la mencionada ampolla que se encuentra en la tapa. Luego de realizar esta operación el Kwik-stik se mantuvo en posición vertical para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad, que contiene el gránulo.
- b. Por último, se presionó la parte inferior de la unidad para lograr una suspensión homogénea.
- c. De inmediato se procedió a saturar el hisopo, que contiene el producto, con el material hidratado y se transfirió a una placa con agar sangre, la cual fue incubada a 37°C. en condiciones anaerobias (jarra de anaerobiosis) durante 24 horas.

## 3. Método de preparación del inóculo

- a. Se realizó la suspensión directa, en solución salina (cloruro de sodio 0.9%), de colonias obtenidas de la placa anteriormente incubada.



*Streptococcus mutans* ATCC  
25175

- b. La turbidez resultante fue inmediatamente ajustada comparándola de manera visual con la turbidez del estándar 0.5 de Mc. Farland.

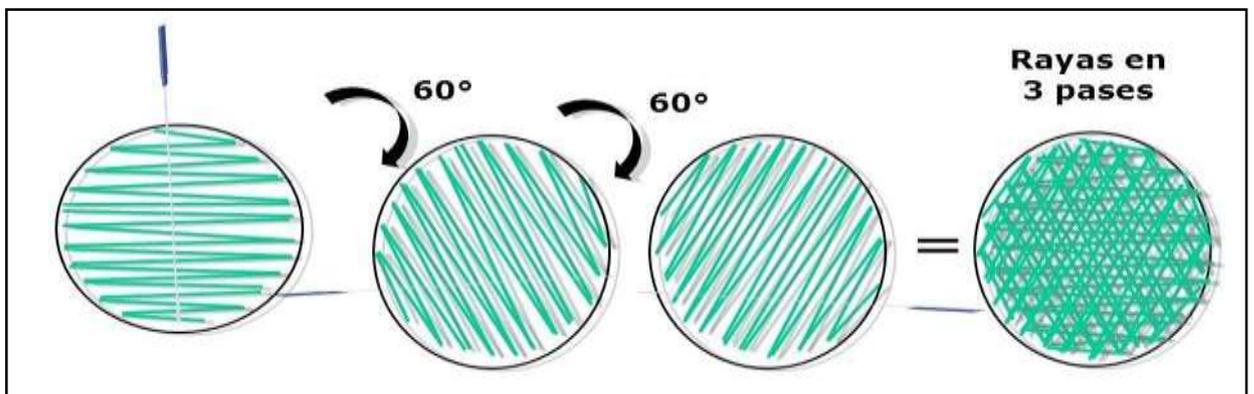


#### 4. Inoculación de placas

Dentro de los 15 minutos posteriores al ajuste de la turbidez del inóculo, se procedió a sumergir un hisopo estéril en la suspensión obtenida; el hisopo se rotó varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo y por encima del nivel del líquido, esto con la finalidad de remover el exceso de inóculo.

Posteriormente se inoculó sobre la superficie seca del agar Muller Hinton sangre, para estose realizaron estrías en tres direcciones diferentes rotando la placa 60° cada vez, esto con la finalidad de asegurar una distribución uniforme del inóculo.

Previamente todas las placas fueron marcadas para posteriormente realizar los pozos empleando un sacabocado de 6 mm de diámetro.





Rotulado de placas



Siembra de placas



Realizando pozos en agar con ayuda de un sacabocado

## 5. Preparación de sustancias experimentales

Se preparó las sustancias experimentales a diferentes concentraciones partiendo del extractoseco, para posteriormente adicionar 20 uL de las mismas, con ayuda de una micropipeta, en cada uno de los pozos realizados anteriormente.

- Extracto de semillas de Ayrampo 90%
- Extracto de semillas de Ayrampo 75%
- Extracto de semillas de Ayrampo 50%
- Extracto de semillas de Ayrampo 25%
- Alcohol de 70°
- Clorhexidina 0,12%





## 6. Incubación

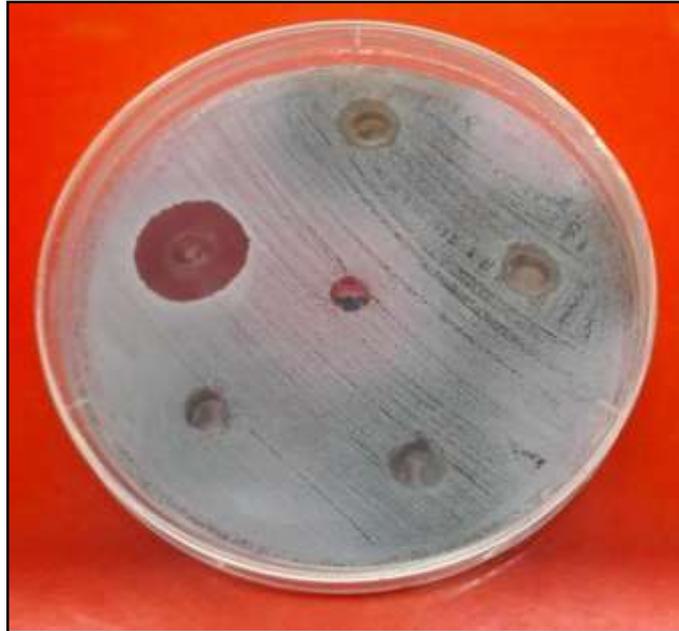
Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y en condiciones anaerobias (jara de anaerobiosis) después de 30 min de adicionados las sustancias experimentales.



## 7. Lectura de resultados

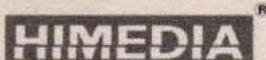
Halos de inhibición de los 5 grupos fueron medidos empleando un vernier.





<b>Microorganismo</b>	<b>Diámetros de inhibición en mm</b>					
	<b>90%</b>	<b>75%</b>	<b>50%</b>	<b>25%</b>	<b>Clorhexidina 0.12%</b>	<b>Etanol 70°</b>
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	10.25	9.14	7.73	6	18.25	6
	10.28	9.15	7.72	6	18.23	6
	10.27	9.13	7.75	6	18.20	6
	10.25	9.14	7.70	6	18.21	6
	10.29	9.10	7.74	6	18.20	6
	10.25	9.13	7.74	6	18.21	6
	10.26	9.10	7.76	6	18.25	6
	10.24	9.14	7.72	6	18.23	6
	10.28	9.13	7.73	6	18.21	6
	10.29	9.15	7.74	6	18.20	6

## ANEXO G. 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> 0000322697
<b>Report No.:</b> 040000779434	<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 16-18 hours at 5% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub>

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

**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> 0000322697
<b>Report No.:</b> 040000779434	<b>Date of Report :</b> 22.12.2017	<b>Expiry Date :</b> Dec-2022

<i>Gentamicin GEN 10 mcg</i>	-	-	-	-	19-26 mm	25mm
<i>Sulphafurazole SF 300 mcg</i>	-	-	-	-	15-23 mm	21mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-25 mm	24mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

**Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034)**

<i>Growth promoting</i>	86	luxuriant	79	91%	-	-
<i>Amoxycylav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	28-36 mm	35mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	36mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	35mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	28mm
<i>Erythromycin E 15 mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	29mm
<i>Linezolid LZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	25-32 mm	30mm
<i>Oxacillin OX 1mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	23mm
<i>Pristinomycin RP 15 mcg</i>	-	-	-	-	21-28 mm	27mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-21 mm	20mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	24-32 mm	30mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

**Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025)**

<i>Growth promoting</i>	81	luxuriant	78	96%	-	-
<i>Amikacin AK 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-26 mm	25mm
<i>Aztreonam AT 3mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm
<i>Cephotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-22 mm	21mm
<i>Ceftazidime CAZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	22-29 mm	28mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	32mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg *</i>	-	-	-	-	16-21 mm	20mm
<i>Imipenem IPM 10 mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	32mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	26mm
<i>Tobramycin TOB 10 mcg *</i>	-	-	-	-	19-25 mm	24mm

**Escherichia coli ATCC 35218**

<i>Growth promoting</i>	82	luxuriant	77	93%	-	-
<i>Amoxycylav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-22 mm	21mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	13-19 mm	17mm

**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 : M173</b>	<b>Material Name : Mueller Hinton Agar</b>	<b>Lot No : 0000322697</b>
<b>Report No.: 040000779434</b>	<b>Date of Report : 22.12.2017</b>	<b>Expiry Date : Dec-2022</b>

<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	12-18 mm	16mm
<i>Piperacillin/Tazobactam PIT 100/10 mcg</i>	-	-	-	-	24-30 mm	28mm
<i>Ticarcillin TI 75 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	21-25 mm	23mm
<b>Enterococcus faecalis ATCC 29212 (WDCM 00087)</b>						
<i>Growth promoting</i>	88	luxuriant	80	90%	-	-
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm (Clear zone)	29mm
<i>Trimethoprim TR 5 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm	27mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	# 17 mm	23mm
<b>Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA) (WDCM 00211)</b>						
<i>Growth promoting</i>	86	luxuriant	85	0	-	-
<i>Oxacillin OX 1 mcg</i>	-	-	-	-	Very Hazy to No Zone	No zone
<b>Sterptococcus pneumoniae ATCC 49619 (On Medium with 5% Sheep Blood)</b>						
<i>Growth promoting</i>	81	luxuriant	76	93%	-	-
<b>Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (Incubated w/5% CO2)</b>						
<i>Growth promoting</i>	85	luxuriant	80	94%	-	-
<b>Haemophilus influenzae ATCC 49247 (On medium w/ Y.E.,NAD &amp; Hematin)</b>						
<i>Growth promoting</i>	83	luxuriant	78	93%	-	-

- . ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
- . NCTC and National Collection of Type Culture 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 ( E ) 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 <= 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 dioxine 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, 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 : M173</b>	<b>Material Name : Mueller Hinton Agar</b>	<b>Lot No : 0000322697</b>
<b>Report No.: 040000779434</b>	<b>Date of Report : 22.12.2017</b>	<b>Expiry Date : Dec-2022</b>

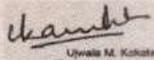
**STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED**

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.

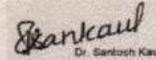
This document has been produced electronically and is valid

  
Prachi Ratnakar

**Microbiologist/Sr.Executive  
Microbiologist**

  
Ujjwala M. Kulkarni

**Asst./Dy/QC Manager**

  
Dr. Santosh Kaul

**Dy/QA Manager**

22.12.2017

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



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> <i>Streptococcus mutans</i> <b>Catalog Number:</b> 0266 <b>Lot Number:</b> 266-32** <b>Reference Number:</b> ATCC® 25175™* <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2022/8/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Alexandra D Quevi <b>Release Date:</b> 2020/9/8
---	---

<b>Macroscopic Features:</b> Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the SBAPother is small, circular and translucent.	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> SBAPother
<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:</b> MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative  <div style="text-align: center;">                       Amanda Kuperus Quality                      Control Manager                      AUTHORIZED SIGNATURE                 </div>
---	---

\*\*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)	<b>High consistency:</b> 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)	<b>Low consistency:</b> 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)	<b>No consistency:</b> 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
-----