



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

**EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Nerium oleander* L.
(LAUREL ROSA) FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC
N° 25175**

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

AUTORES

Bach. GELACIO CHISCOL, ROSA MARITZA
<https://orcid.org/0000-0001-6228-6698>

Bach. VEGA CASTAÑEDA, VICTOR HUGO
<https://orcid.org/0000-0002-7037-7538>

ASESOR

Mg. FLORES LOPEZ, OSCAR BERNUY
<https://orcid.org/0000-0001-9091-2537>

LIMA – PERÚ

2022

Dedicatoria

A Dios por permitirme llegar a este momento especial en mi vida y guiar mi camino, a mi madre por sus sabios consejos; por ser mi mayor inspiración y fuerza, a mis hermanos por su apoyo y comprensión.

Rosa Maritza Gelacio Chiscol

A Dios y a mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

Victor Hugo Vega Castañeda

Agradecimiento

Agradezco y dedico esta tesis a Dios, ser divino por darme la vida y guiar mis pasos día a día y a mis padres, por su comprensión, motivación y apoyo que me han brindado para lograr todas y cada una de mis metas, así como me impulsaron a lograr mis sueños y anhelos.

A mis hermanas gracias por su apoyo, cariño y por estar en los momentos más importantes de mi vida.

Por el tiempo dedicación y paciencia en la elaboración de este documento al Mg. Q.F. Oscar Bernuy Flores López director de tesis.

A mis maestros por sus enseñanzas para desarrollarme profesionalmente y haberme brindado todos sus conocimientos, en especial al Mg. Q.F. Martin Silva Romero.

A todos mis amigos y compañeros por compartir tantos momentos, tan especiales que han pasado en lo largo de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Enfoque y diseño de investigación.....	14
2.2 Población, muestra y muestreo.....	14
2.3 Variables de investigación	15
2.4 Técnica e instrumento de recolección de datos	15
2.5 Plan de recolección de datos	15
2.6. Métodos de análisis estadísticos.....	19
2.7 Aspectos éticos	19
III. RESULTADOS	20
IV. DISCUSIÓN	27
4.1. Discusión	27
4.2. Conclusiones.....	29
4.3 Recomendaciones	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	36

Índice de Tablas

Tabla 1. Estudio fitoquímico del extracto etanolico de <i>Nerium oleander</i> L. (laurel rosa)	20
Tabla 2. Pruebas de solubilidad del extracto etanolico de <i>Nerium oleander</i> L. (laurel rosa) frente a diferentes solventes	21
Tabla 3. Estadística descriptiva de los datos recolectados para los grupos experimentales y control sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175:.....	22
Tabla 4. Análisis de la distribución normal para cada grupo de tratamientos.....	24
Tabla 5. Análisis de la homogeneidad de varianzas	24
Tabla 6. Análisis de la varianza (ANOVA) de los grupos de tratamientos.....	25
Tabla 7. Análisis de los datos de los grupos por medio de la prueba de Tukey por sub grupos homogéneos	25
Tabla 8. Valoración de la actividad antibacteriana de <i>Nerium oleander</i> L. según escala de Duraffourd	26

Índice de Figuras

Figura 1. Comportamiento del tamaño de los halos de inhibición de los grupos control y experimentales sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	23
Figura 2. Recolección de la especie vegetal	44
Figura 3. Lavado y desinfección de la especie vegetal	44
Figura 4. Secado de las hojas a temperatura ambiente	45
Figura 5. Secado de las hojas en estufa	45
Figura 6. Triturado manual y pulverizado de las hojas	46
Figura 7. Tamizado y maceración de <i>Nerium oleander</i> L.....	46
Figura 8. Filtrado y evaporación del macerado	47
Figura 9. Extracto etanólico de <i>Nerium oleander</i> L.	47
Figura 10. Solventes empleados en la prueba de solubilidad	48
Figura 11. Prueba de solubilidad.....	48
Figura 12. Tamizaje fitoquímico de <i>Nerium oleander</i> L.	49
Figura 13. Activación de la cepa de <i>Streptococcus mutans</i>	49
Figura 13. Preparación del inóculo de trabajo	50
Figura 13. Sembrado de la cepa de <i>Streptococcus mutans</i>	50
Figura 13. Aplicación de los extractos e incubación de la cepa de <i>Streptococcus mutans</i>	51
Figura 13. Recolección de datos	52

Índice de Anexos

Anexo A: Matriz de consistencia	37
Anexo B: Ficha de recolección de datos	39
Anexo C: Operacionalización de las variables	40
Anexo D: Constancia de identificación taxonómica.....	41
Anexo E: Certificado de análisis de la cepa microbiológica	42
Anexo E: Evidencias del trabajo de campo	44

RESUMEN

Objetivo: Demostrar el efecto antibacteriano “in vitro” del extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175

Métodos: El estudio presentó un enfoque cuantitativo, explicativo de diseño experimental y prospectivo, la población de estudio estuvo conformada por 2000kg de la especie vegetal de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) obtenido del distrito de Pimentel, provincia de Chiclayo, departamento de Lambayeque, la muestra obtenida fue de 1500gr. hojas de la planta; el extracto se obtuvo por medio de maceración y se expuso a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175 mediante el método de Kirby Bauer.

Resultados: El estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Nerium oleander L.* presentó compuestos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, aminoácidos azufrados, saponinas y taninos; también el extracto fue muy soluble a cloroformo y metanol y se observa que este produjo halos de inhibición promedio frente a *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175 de $10,41\text{mm} \pm 0,38$ y $12,08\text{mm} \pm 0,31$ para el 75% y 100% respectivamente; así mismo, clorhexidina al 1% presentó mayor efecto antibacteriano que los extractos de *Nerium oleander L.*

Conclusiones: El extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) presentó efecto antibacteriano “in vitro” sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175 a las concentraciones del 75% y 100%.

Palabras claves: *Nerium oleander L.*, *Streptococcus mutans*, antibacteriano, Laurel rosa, extracto etanólico.

ABSTRACT

Objective: To demonstrate the antibacterial effect "in vitro" of the ethanolic extract of the leaves of *Nerium oleander* L. (Pink Laurel) on *Streptococcus mutans* ATCC N ° 25175

Methods: The study presented a quantitative, explanatory approach of experimental and prospective design, the study population was made up of 2000 kg of the plant species of *Nerium oleander* L. (pink laurel) obtained from the district of Pimentel, province of Chiclayo, department of Lambayeque, the sample obtained was 1500 gr. leaves of the plant; the extract was obtained by maceration and exposed to strains of *Streptococcus mutans* ATCC No. 25175 using the Kirby Bauer method.

Results: The phytochemical study of the ethanolic extract of *Nerium oleander* L. presented phenolic compounds, flavonoids, amino acids, sulfur amino acids, saponins and tannins; The extract was also very soluble to chloroform and methanol and it is observed that it produced average inhibition halos against *Streptococcus mutans* ATCC N ° 25175 of 10.41mm + 0.38 and 12.08mm + 0.31 for 75% and 100% respectively; Likewise, 1% chlorhexidine had a greater antibacterial effect than extracts of *Nerium oleander* L.

Conclusions: The ethanolic extract of the leaves of *Nerium oleander* L. (Pink laurel) presented antibacterial effect "in vitro" on *Streptococcus mutans* ATCC N ° 25175 at concentrations of 75% and 100%.

Key words: *Nerium oleander* L., *Streptococcus mutans*, antibacterial, Rose laurel, ethanolic extract.

I. INTRODUCCIÓN

Durante lo largo de la historia y hasta la fecha las infecciones bacterianas se han venido tratando con medicamentos antibacterianos, sin embargo, gran parte de estas bacterias han desarrollado la capacidad para evadir el efecto de los antibacterianos, convirtiéndose en una crisis a nivel mundial. *Streptococcus mutans* es una de ellas y es causante de infecciones graves como endocarditis hasta infecciones no graves como la caries dental que es muy común, afectando a toda la población. La resistencia bacteriana conlleva al fracaso de la terapia con fármacos que se usan de manera rutinaria, trayendo como consecuencias que las infecciones persistan y aumente el riesgo de propagación¹. La patogenicidad de *S. mutans* radica en un mecanismo regulado genéticamente, produciendo genes virulentos que han sido evidenciados a través de estudios hasta en un 63.6% en personas de diferentes edades².

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018 reveló que existe a nivel mundial un alto índice de resistencia a los antibióticos y que las infecciones comunes se han convertido en farmacorresistentes³. Asimismo, en abril del presente año, una universidad española, verificó mediante un estudio que el fármaco Amoxicilina presenta resistencia a *S. aureus*, *Streptococcus mutans* y *S. sanguis*, microorganismos causantes de infecciones a nivel bucal⁴. Por otro lado, en Colombia se reportó que *Streptococcus mutans* ha desarrollado resistencia a varios medicamentos, como la Amoxicilina cuya resistencia corresponde a un 15%⁵.

En el Perú el Ministerio de Salud en el 2019 señaló que el 90.4% de la población sufre de caries dental, enfermedad que se encuentra relacionada estrechamente con *Streptococcus mutans*, además indicó ser altamente peligroso en pacientes diabéticos y gestantes⁶. Por otro parte, en el Hospital Regional de Lambayeque, a través de un estudio se determinó que existe una prevalencia de colonización por *Streptococcus mutans* de 14,2% en pacientes neonatos, evidenciando que es una población susceptible al desarrollo de caries dental tempranamente⁷.

Ante esta problemática de resistencia bacteriana por *Streptococcus mutans* nos pone en un escenario en cual deben buscarse opciones terapéuticas para tratar estas infecciones, por ejemplo, mediante el uso de plantas medicinales, es por ello,

que la presente investigación intenta comprobar si existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175.

Nerium oleander L. (laurel rosa) es un arbusto perteneciente a la familia Apocynaceae, es ornamental debido a su floración y se puede encontrar en jardines, canteros y a lo largo de las carreteras⁸. Mide hasta 3 metros de alto, su crecimiento es rápido, siempre mantiene su follaje. Sus hojas son perennes, de color verde oscuro a gris, de forma lanceolada y entera, miden de 6 a 12cm de largo y 2.5cm de ancho. De manera general sus flores aparecen en primavera y duran hasta otoño, son de color rosa, blancas o violetas. Su composición química está formada por flavonoides, alcaloides, esteroides, glucósidos cardiacos, taninos, ácido cinámico, ácido clorogénico, etc. Sus efectos terapéuticos son cardiotónico, anticancerígeno, diurético, antifúngico, antibacteriano, expectorante, escabicida, antiinflamatorio, purgante, antileproso, entre otros⁹.

Streptococcus mutans fue puntualizada por el microbiólogo Clarke en 1924, quien observo una diferencia de forma con relación al pH de su medio en piezas dentales cariadas¹⁰. Es una bacteria que forma parte de la microbiota bucal en los humanos y es la responsable de la caries dental y de infecciones graves como bacteriemia y endocarditis; varios estudios precisan que *Streptococcus mutans* se transmite durante los primeros años de vida de madre a hijo, transmisión vertical. Morfológicamente es un coco Gram positivo que forma cadenas, no presenta movimiento, es catalasa negativo y anaerobio facultativo¹¹. Adopta la forma de bacilo cuando se encuentra en un medio ácido y la forma de coco cuando está en un medio neutro o alcalino. Es productor de ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos como: sacarosa, glucosa y fructuosa. Sintetiza un polisacárido extracelular en la biopelícula dental, con la ayuda de enzimas llamadas glucosiltrasnsferasa¹².

A nivel internacional contamos con los estudios de Mohammed N. y Kareem R. (2021) en su artículo, cuyo objetivo fue evaluar la eficacia y citotoxicidad anti *Pseudomona aeruginosa* del extracto alcohólico de *Nerium oleander L.* por microdilución en caldo. Los resultados revelaron que el extracto alcohólico tiene actividad antibacteriana según la concentración y la cepa bacteriana, además, el

extracto en concentraciones de 600 y 1200mg/mL durante cuatro horas disminuyó el índice mitótico de las células de *P. aeruginosa* en un 50%¹³.

También, Mouhcine M. et al (2019) elaboraron un estudio con el objetivo de investigar las actividades citotóxicas, antioxidantes y antibacterianas de extractos crudos etanólicos y acuosos de hojas de *Nerium oleander L.* Los resultados mostraron que ambos extractos redujeron la viabilidad celular, siendo el extracto acuoso más activo que el extracto etanólico; la actividad antioxidante mostró que los extractos de *N. oleander* poseen un efecto preventivo frente a la oxidación del β -caroteno por los radicales peróxidos y la prueba antibacteriana mostró que los extractos etanólicos y acuosos de *N. oleander* tenían un efecto antibacteriano moderado limitado solo a las bacterias Gram-positivas¹⁴.

Asimismo, Bameta A. et al. (2017), en su estudio publicaron como objetivo evaluar los componentes del cribado fitoquímico y la sensibilidad microbiana haciendo uso de diversos extractos (metanólico, etanólico, éter y cloroformo) a partir de hojas y tallos de plantas de *Nerium oleander L.* sobre bacterias *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas*, *S. typhi* y cepas de hongos: *A. niger*, *C. neoformans*, *S. cerevisiae* y *C. albicans*. Los resultados indicaron que las hojas de *N. oleander* presenta más compuestos fitoquímicos en los tallos, los cuales fueron fenoles, esteroides, saponinas, taninos y cumarinas; el extracto metanólico mostró una potente actividad contra *S. aureus*, *B. subtilis* y *Pseudomonas*. La zona inhibitoria más alta se registró en el caso de *Pseudomonas* con 11mm de diámetro de inhibición¹⁵.

A nivel nacional podemos citar el estudio de Chumacero P. y León E. (2021) quienes tuvieron por objetivo determinar el efecto antibacteriano de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) a partir de extractos elaborados con etanol y metanol sobre *Escherichia coli*. El estudio correspondió a un diseño experimental y prospectivo, los extractos se prepararon por maceración y filtrado y la sensibilidad de la bacteria *E. coli* se determinó por difusión en disco. Según los resultados se apreció halos inhibitorios para todos los extractos con etanol y metanol, siendo para el extracto con etanol del 100% un diámetro de 18,913mm y para el 75% 16,107mm; asimismo, para el extracto con metanol al 100% correspondió un diámetro de 21,040mm y para el 75% 17,107mm; indicando que el extracto con etanol y metanol de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) si presenta efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*¹⁶.

Por su parte, Rojas R. (2019) elaboró su tesis con el propósito de determinar el efecto de *Nerium oleander L.*, elaboraron un decocto en varias concentraciones al 0,5%, 1,0%, 1,5% y 2% y las expusieron a larvas III de la especie *Spodoptera frugiperda*. El estudio fue experimental y transversal; en los resultados se pudo comprobar que el decocto en una concentración del 2% causó una reducida viabilidad de las larvas con un porcentaje del 40% y al 60% su letalidad fue mucho mayor. De acuerdo con los resultados el autor concluyó que el decocto preparado a base de *Nerium oleander L.* posee efecto larvicida frente a *Spodoptera frugiperda*¹⁷.

Por su parte, Fernández H. (2016) elaboró su estudio con el propósito de determinar el efecto de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) formulado en una pasta a diferentes concentraciones y se usó como rodenticida. Los resultados pudieron demostrar que el laurel rosa llega a causar un efecto letal que se relaciona directamente con la concentración de la mezcla, por ejemplo, a partir del 30, 40 y 50% causó la muerte; por lo tanto, se concluyó que *Nerium oleander L.* (laurel rosa) presenta efecto rodenticida a partir de una concentración del 30% en los preparados, produciendo su efecto máximo en 7 días¹⁸.

Por lo tanto, se formula el objetivo de Demostrar el efecto antibacteriano “in vitro” del extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175.

Así mismo, se formula la hipótesis del estudio: El extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Enfoque y diseño de investigación

El presente estudio pertenece a un enfoque cuantitativo, basado en características numéricas que serán recolectadas y analizadas por cuadros estadísticos^{19,20}.

Además, el diseño corresponde a un estudio experimental y explicativo, en donde el investigador realizó algunas modificaciones en una de las variables para visualizar su efecto en otra de las variables²¹.

Asimismo, es un estudio prospectivo porque se realizó en tiempo presente donde los datos fueron obtenidos culminada la elaboración del estudio y es transversal porque la información fue obtenida en un solo momento específico²².

2.2 Población, muestra y muestreo

Población vegetal

La población estuvo formada por 2000Kg de la especie vegetal *Nerium oleander L.* (laurel rosa), la misma que se obtuvo del distrito de Pimentel, provincia de Chiclayo, departamento de Lambayeque, ubicada en una Latitud: 6° 50' 13" Sur Longitud: 79° 56' 10" Oeste m.s.n.m²³.

Población microbiológica

Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175

Muestra vegetal:

La muestra escogida presentó un peso de 1500 gramos de hojas de *Nerium oleander L.* (laurel rosa).

Muestra microbiológica:

15 placas Petri con cultivos de *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175

El muestreo fue no probabilístico y por conveniencia del investigador, ya que adquirió la muestra por facilidad de acceso y disponibilidad, de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión que están referidos al buen estado de conservación de la planta²⁴.

2.3 Variables de investigación

Variable independiente: Extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander* L. (Laurel rosa), esta variable fue manipulada por el investigador para producir un efecto en la variable dependiente.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175, los resultados de esta variable estuvieron sujetos a los cambios en la variable independiente.

2.4 Técnica e instrumento de recolección de datos

Se empleó la técnica de Kirby-Bauer modificado en pozo, en la cual, mediante la medición de los halos inhibitorios formados alrededor del pozo se relacionó su efecto antibacteriano de la planta^{25,26}.

Como instrumento se contó con un equipo digital llamado Vernier o Pie de Rey y una tabla de registro donde se registraron los datos.

2.5 Plan de recolección de datos

2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos

Antes de recolectar la muestra *Nerium oleander* L. (Laurel rosa) se solicitó el permiso al propietario de la zona para ingresar al lugar del sembrío, a las primeras horas de la mañana.

Se tomó una muestra representativa de *Nerium oleander* L. (Laurel rosa) para su identificación taxonómica que fue realizada por un biólogo especialista en botánica.

2.5.2. Recolección de la muestra vegetal

La muestra de hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) fueron obtenidas en las primeras horas de la mañana, recolectando aproximadamente 1500 gramos de las hojas, teniendo presente los criterios de exclusión e inclusión para una correcta selección.

Las hojas fueron arrancadas de las ramas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) y luego fueron llevadas al laboratorio envueltas en papel Kraft.

En el laboratorio fueron lavadas con abundante agua y desinfectadas por 5 minutos con hipoclorito de sodio al 0,5%, luego fueron enjuagadas nuevamente con abundante agua potable.

Las hojas fueron colocadas sobre la mesa de forma extendida por 48 horas, cerca de una corriente de aire natural para su secado, después de ese tiempo fueron llevadas a estufa a 45°C para eliminar completamente rastros de agua y deshidratar las hojas; luego se procedió a la trituration manual.

2.5.3. Preparación del extracto etanólico de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa)¹⁶:

Las hojas secas y trituradas y fueron llevadas a un molino con cuchillas para obtener un producto en polvo, el mismo que pasó por un tamiz ASTM N°30.

El polvo obtenido (800gr) fue colocado en un frasco ámbar de 2.5 litros y se adicionó 800mL de alcohol de 96° con el objetivo de macerarlo por 10 días con agitación cada 8 horas.

Después de los 10 días de maceración se filtró y llevó nuevamente a la estufa a una temperatura de 50°C, se evaporó completamente el alcohol, el residuo que se obtuvo fue el extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa).

Con el extracto obtenido se procedió a preparar con etanol 96°, concentraciones al 100% (100mg/ml) y 75% (75 mg/ml) del extracto de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa).

2.5.4. Prueba de solubilidad:

Se agregó 5mg del extracto etanólico de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) en 6 tubos de ensayo, a cada tubo de ensayo se agregó 1mL de cada solvente de distinta polaridad según el cuadro adjunto:

Tubo	Solvente
1	Agua destilada
2	Etanol
3	Metanol
4	Butanol
5	Isopropanol
6	Acetona
7	Éter etílico
8	Cloroformo
9	Dimetilsulfóxido

La solubilidad se determinó según la siguiente leyenda:

- (-) Insoluble
- (+) Poco soluble
- (++) Medianamente soluble
- (+++) Muy soluble

2.5.5. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Nerium oleander L.*²⁷:

Se disolvió 1gr del extracto etanólico seco de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) en 10mL del solvente que presentó mayor solubilidad, posteriormente se agregó 0,25mL de la sustancia en un tubo de ensayo de 10mL y aplicaron los reactivos que se muestran a continuación. La reacción positiva se confirmó por el cambio de coloración o precipitado característico según el tipo de reacción.

Tubo	Ensayo	Metabolito
1	Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos
2	Dragendorff	Alcaloides
3	H ₂ SO ₄	Flavonoides
4	NaOH al 5%	Quinonas
5	Gelatina-NaCl	Taninos
6	Salkowski	Saponinas
7	Lieberman-Burchard	Triterpenos y esteroides
8	Acetato de Plomo	Flavonoides

2.5.6. Reactivación de la cepa de *Streptococcus mutans*^{28,29}

La cepa ATCC liofilizada se retiró de su envase original para mezclarse con la ampolla de reconstitución, luego con un hisopo se embebió en la cepa reconstituida, se sembró en agar TSA y llevó a incubación en medio anaeróbico dentro de una jarra de anaerobiosis por 24 a 48 horas.

2.5.7. Evaluación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa)³⁰:

- De las colonias formadas en la placa se prepararon diluciones seriadas con suero fisiológico para el ensayo, hasta llegar a la escala de MacFarland de 0.5 UFC/mL.
- Con un hisopo estéril se sembró en forma de estrías en un medio de Agar Miuller Hinton en todas las placas.
- Con un sacabocados de 6mm de diámetro se realizaron 2 perforaciones por cada placa, que viene a ser los pozos.
- En un pozo se colocó el control positivo (50µL de clorhexidina al 1%), en el otro pozo el control negativo (50µL etílico al 96%).
- En otra placa se colocó en cada pozo 50µl de extracto etanólico de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) al 100% y en otro pozo al 75%.

- Se realizaron 15 repeticiones por cada placa.
- Por último, las muestras fueron llevadas a la incubadora por 24 horas a 37°C en anaerobiosis, después de este tiempo se retiraron de la incubadora y se procedió a la medición de los halos de inhibición con el vernier digital. Los datos se colocaron en la ficha de registro de recolección de datos.

2.6. Métodos de análisis estadísticos

Los datos recolectados fueron analizados mediante las pruebas de ANOVA y TUKEY mediante un programa SPSS ver.26 con el propósito de aceptar o rechazar la hipótesis general^{31,32}.

2.7 Aspectos éticos

El estudio se basó en normas éticas de veracidad, donde los investigadores confirman que sus resultados corresponden íntegramente a su estudio, por otro lado, el estudio cumplió con los protocolos de bioseguridad y el plan de vigilancia, prevención y control del COVID-19; así como, la guía para el manejo de residuos peligrosos.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Nerium oleander* L. (laurel rosa)

ENSAYO	RESULTADO
Dragendorff	Alcaloides (-)
FeCl ₃	Compuestos fenólicos (++)
H ₂ SO ₄	Flavonoides (+)
Salkowski	Saponinas (+)
Liebermann–Burchard	Triterpenos y esteroides (-)
Gelatina	Taninos (+)

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la tabla 1, se muestra el estudio fitoquímico cualitativo realizado al extracto etanólico de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) mediante los reactivos mencionados, en los ensayos se demostró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y taninos, resultando negativo para las reacciones de alcaloides, triterpenos y esteroides.

Tabla 2. Pruebas de solubilidad del extracto etanólico de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) frente a diferentes solventes

REACTIVO	RESULTADO
Agua destilada	(-)
Metanol	(+++)
Etanol	(++)
Acetona	(++)
<i>Dimetilsulfóxido</i> (DMSO)	(++)
Cloroformo	(+++)
Alcohol Isopropílico	(+)
Alcohol ter-butílico	(+)
Éter	(+)

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

- (+++) : Muy soluble
- (++) : Soluble
- (+) : Medianamente soluble
- (-) : Insoluble

Interpretación:

En la tabla 2 se observa los resultados al exponer el extracto etanólico de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) frente a diferentes solventes de distinta polaridad se observó que es muy soluble a cloroformo y metanol, soluble a etanol, acetona y dimetilsulfóxido, medianamente soluble al alcohol isopropílico, alcohol ter-butílico y éter e insoluble al agua destilada.

Tabla 3. Estadística descriptiva de los datos recolectados para los grupos experimentales y control sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175:

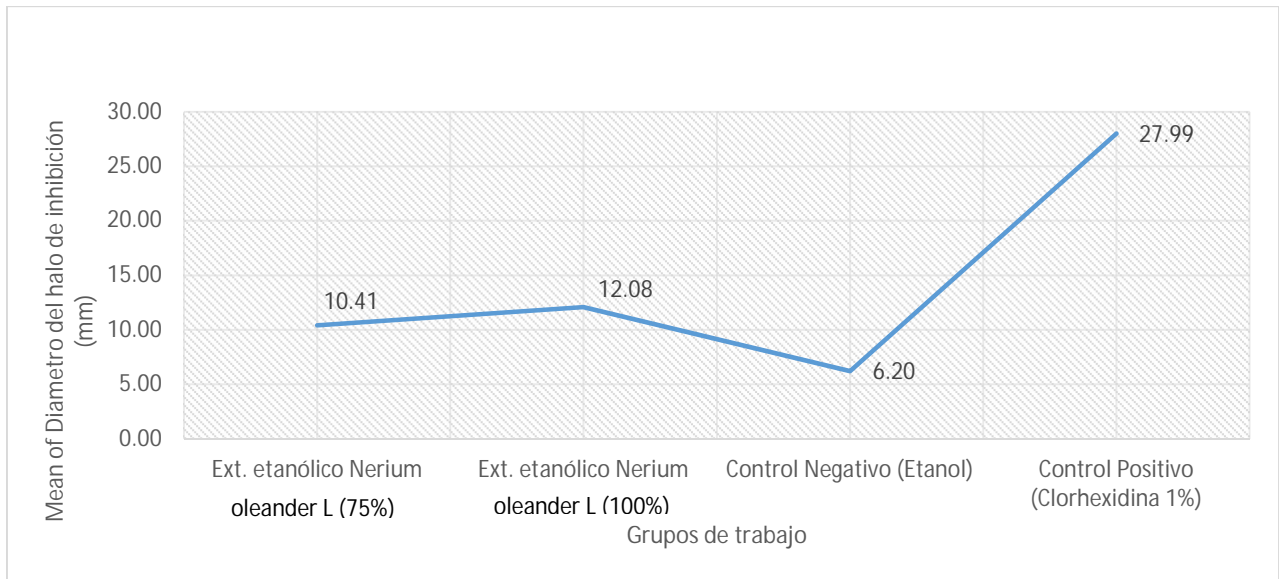
Grupos	N	Media	Std. Desviación	Std. Error	95% Intervalo de confianza de la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Ext. etanólico Nerium oleander L (75%)	15	10,41	0,38	0,10	10,20	10,62	9,50	11,00
Ext. etanólico Nerium oleander L (100%)	15	12,08	0,31	0,08	11,91	12,25	11,40	12,60
Control Negativo (Etanol)	15	6,20	0,16	0,04	6,11	6,29	5,90	6,40
Control Positivo (Clorhexidina 1%)	15	27,99	0,36	0,09	27,79	28,19	27,20	28,50

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

La tabla 3 muestra el análisis estadístico realizados a los datos de los grupos experimentales tratados con el extracto etanólico de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) al 75% y 100%, así como los grupos control tratados con etanol (negativo) y clorhexidina 1% (positivo), se muestran los parámetros estadísticos descriptivos de media, desviación estándar, error estándar, los intervalos de confianza inferior y superior, el valor máximo y mínimo encontrado con un nivel de confianza del 95%. El valor promedio con respecto al tamaño del halo de inhibición obtenido para el extracto etanólico de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) al 75% fue de 10,41mm \pm 0,38 y 12,08mm \pm 0,31 para el 100%; del mismo modo, el control negativo obtuvo un halo promedio de 6,20mm \pm 0,16 y el control positivo de 27,99mm \pm 0,36.

Figura 1. Comportamiento del tamaño de los halos de inhibición de los grupos control y experimentales sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

La figura 1 muestra los valores promedio de los halos de inhibición para cada grupo de tratamientos, se observa una relación dependiente concentración de los grupos experimentales con respecto al tamaño del halo de inhibición observado, así mismo, se muestra un efecto superior en el control positivo (clorhexidina 1%) en relación a los grupos experimentales; así mismo, se muestra un efecto superior de estos últimos en comparación con el grupo control negativo.

Tabla 4. Análisis de la distribución normal para cada grupo de tratamientos

	Grupo de tratamientos	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Diámetro del halo de inhibición (mm)	Ext. etanólico Nerium oleander L (75%)	0,941	15	0,392
	Ext. etanólico Nerium oleander L (100%)	0,968	15	0,823
	Control Negativo (Etanol)	0,918	15	0,178
	Control Positivo (Clorhexidina 1%)	0,918	15	0,177

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Fuente: SPSS ver. 26.0

Interpretación:

La tabla 4 muestra el análisis de la distribución normal realizado a los datos de cada grupo (experimental y control) mediante la prueba de Shapiro-Wilk, con un nivel de significancia alfa = 0.05, se observa distribución normal en todos los grupos de datos los cuales presentan un valor de significancia superior al 0,05.

Tabla 5. Análisis de la homogeneidad de varianzas

		Levene			p-valor
		Statistic	df1	df2	
Diámetro del halo de inhibición	Basado en la media	1,367	3	56	0,262
	Basado en la mediana	1,156	3	56	0,335
	Basado en la media y ajustado con df	1,156	3	42,859	0,338
		1,288	3	56	0,287
	Basado en la media recortada				

Fuente: SPSS ver. 26.0

Interpretación:

La tabla 5, se muestra el análisis del supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la prueba estadística de Levene, esta prueba confirma luego del análisis realizado al presentar un valor $p=0,189$ superior al nivel de significancia alfa de 0,05 que los grupos de datos analizados presentan varianza similar, por lo tanto, se

rechaza la hipótesis alterna y acepta la hipótesis nula que confirma la homogeneidad de las varianzas.

Tabla 6. Análisis de la varianza (ANOVA) de los grupos de tratamientos

Diámetro del halo de inhibición					
	Suma de cuadrados	df	Media al cuadrado	F	p-valor.
Entre grupos	4094,279	3	1364,760	13573,267	0,000
Dentro de los grupos	5,631	56	0,101		
Total	4099,910	59			

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

La tabla 6 se muestra el análisis de la varianza o prueba de ANOVA realizados a los grupos de tratamientos para determinar el comportamiento similar de los grupos al comparar sus halos de inhibición promedio. El p-valor obtenido mediante la prueba de ANOVA fue menor al nivel de significancia (0,05), lo que indica que existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95% en al menos en uno de los grupos de datos analizados.

Tabla 7. Análisis de los datos de los grupos por medio de la prueba de Tukey por sub grupos homogéneos

	1	2	3	4
Control Negativo (Etanol)	15	6,20		
Ext. etanólico Nerium oleander L (75%)	15	10,40		
Ext. etanólico Nerium oleander L (100%)	15		12,08	
Control Positivo (Clorhexidina 1%)	15			27,98

Fuente: SPSS ver. 26

Interpretación:

La tabla 7 muestra la comparación de las medias individuos de cada grupo de tratamiento mediante la prueba de Tukey por subgrupo homogéneos, nos permite

determinar luego de la prueba de ANOVA cuál de las medias presenta diferencia estadísticamente significativa comparando la media de cada grupo de datos. Se observa que las medias de los datos de todos los tratamientos analizados presentan diferencia significativa entre sí.

Tabla 8. Valoración de la actividad antibacteriana de *Nerium oleander* L. según escala de Duraffourd

Tratamiento	Sensibilidad nula ≤ 8 mm	Sensible 9–14 mm	Muy sensible 15-19 mm	Sumamente sensible ≥ 20 mm
Control Negativo (Etanol)	6,20			
Ext. etanólico <i>Nerium oleander</i> L (75%)		10,40		
Ext. etanólico <i>Nerium oleander</i> L (100%)		12,08		
Control Positivo (Clorhexidina 1%)				27,98

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

En la tabla 8, se observa el análisis de la actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* de los tratamientos a base del extracto etanólico de *Nerium oleander* L. al 75% y 100% y de los grupos control mediante la escala valorativa de sensibilidad antibacteriana de Duraffourd; se observa que *Streptococcus mutans* es sensible al tratamiento con el extracto etanólico de *Nerium oleander* L. al 75% y 100%, es sumamente sensible a clorhexidina al 1% y presenta sensibilidad nula al etanol.

IV. DISCUSIÓN

4.1. Discusión

Las infecciones bacterianas se han convertido en una amenaza para la salud de las personas, sobre todo las producidas por bacterias resistentes las cuales producen complicaciones en los tratamientos antibacterianos, tal es el caso de *Streptococcus mutans*; por tal motivo, la presente investigación buscó obtener una vía alternativa al tratamiento de esta bacteria mediante un estudio in vitro de una planta muy común en nuestra localidad *Nerium oleander L.* conocida como “laurel rosa”. Los resultados del estudio se discuten a continuación.

El estudio fitoquímico realizado al extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) revelaron la presencia de compuestos fenólicos en altas concentraciones; así como, aminoácidos, flavonoides, saponinas y taninos, los que se muestran en la tabla 1.

Por otro lado, en la tabla 2 se muestran las pruebas de solubilidad realizadas al extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa), donde se observa que el extracto es muy soluble al cloroformo y metanol; soluble al etanol, acetona y DMSO y medianamente soluble al alcohol isopropílico, alcohol ter-butílico y éter, pero es insoluble en agua.

La tabla 3, muestra los datos promedio de los halos de inhibición obtenidos por los extractos etanólicos al 100% y 75% de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) y el control negativo (etanol) y positivo (clorhexidina 1%), observando halos de inhibición de 10,41mm \pm 0,38 para el extracto al 75% y 12,08mm \pm 0,31 para el 100%; del mismo modo, el control negativo obtuvo un halo promedio de 6,20mm \pm 0,16 y el control positivo de 27,99mm \pm 0,36. Del mismo modo, se observa en la figura 1 el comportamiento del efecto antibacteriano en función del tamaño de los halos de inhibición, se observa un aparente efecto antibacteriano superior en el extracto etanólico al 100%, pero no supera el efecto producido por el control positivo (clorhexidina 1%).

Los datos obtenidos fueron analizados mediante estadística descriptiva e inferencial, para lo cual se realizaron pruebas de distribución normal mediante

la prueba de Shapiro-Wilk, presentando todos los grupos distribución normal; así mismo, se determinó homogeneidad en sus varianzas mediante la aplicación de la prueba de Levene, encontrando de manera similar varianzas homogéneas.

El análisis comparativo de los datos se realizó mediante la prueba de ANOVA, la cual mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de datos analizados y la prueba de Tukey permitió comparar el efecto producido sobre *Streptococcus mutans* por cada grupo de datos, donde se demostró que todos los grupos presentan efectos diferentes, siendo el de mayor efecto antibacteriano sobre esta bacteria el control positivo de clorhexidina al 1%, seguida por el extracto etanólico al 100%, la diferencia significativa entre el grupo del extracto etanólico al 75% y el control negativo demostró su efecto antibacteriano.

Al comparar los halos de inhibición obtenidos en cada grupo de datos mediante la escala de Duraffourd se observó que *Streptococcus mutans* es sumamente sensible a clorhexidina al 1%, sensible a los extractos etanólicos de *Nerium oleander* L. al 75% y 100% y presenta sensibilidad nula al etanol.

Estudios similares realizados han demostrado la presencia de actividad antibacteriana de *Nerium oleander* L., como el realizado por Mohammed N. y Kareem R. (2021) en su investigación el objetivo fue evaluar la eficacia y citotoxicidad anti *Pseudomonas aeruginosa* del extracto alcohólico de *Nerium oleander* L. por microdilución en caldo, encontrando actividad antibacteriana de los extractos a concentraciones de 600 y 1200mg/mL.

Así mismo, Mouhcine M. et al (2019) elaboraron un estudio con el objetivo de investigar las actividades citotóxicas, antioxidantes y antibacterianas de los extractos crudos etanólicos y acuosos de hojas de *Nerium oleander* L. encontrando que ambos tipos de extractos etanólicos y acuosos tienen efecto antibacteriano limitado contra distintas bacterias Gram-positivas.

Diversos autores demuestran que el poder de las plantas se debe a la presencia de metabolitos secundarios, en tal sentido, estudios como el de Bameta A. et al. (2017), demostraron de manera similar la presencia de fenoles, esteroides, saponinas, taninos y cumarina siendo mayor la

concentración en los tallos de la planta, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el estudio. Además, demostró actividad antibacteriana en diversos extractos (metanólico, etanólico, éter y cloroformo) a partir de hojas y tallos de plantas de *Nerium oleander L.* presentando el extracto metanólico una potente actividad contra *S. aureus*, *B. subtilis* y *Pseudomonas*.

De manera similar Chumacero P. y León E. (2021) determinaron el efecto antibacteriano de *Nerium oleander L.* (laurel rosa) a partir de extractos elaborados con etanol y metanol sobre *Escherichia coli*, los resultados mostraron para el extracto con etanol del 100% un diámetro de 18,913mm y para el 75% 16,107mm; asimismo, para el extracto con metanol al 100% correspondió un diámetro de 21,040mm y para el 75% 17,107mm; resultados que se observan mayores a los encontrados, sin embargo, se debe considerar la sensibilidad de cada bacteria.

4.2. Conclusiones

- Mediante el estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) se observó la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y taninos.
- El extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) presentó ser soluble en etanol y muy soluble a cloroformo y metanol.
- El extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) al 100% presentó efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175, presentando halo de inhibición de 12,08mm \pm 0,31.
- El extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) al 75% presentó efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175, presentando halo de inhibición de 10,41mm \pm 0,38.
- El extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) presentó menor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175 comparado con Clorhexidina al 1%.

4.3 Recomendaciones

- Exponer diferentes tipos de extractos a bacterias y hongos para profundizar en el efecto antibacteriano y antimicótico de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa).
- Determinar mediante pruebas analíticas los tipos de metabolitos secundarios que presenta *Nerium oleander L.* (Laurel rosa).
- Promover el uso de esta especie vegetal como tratamiento complementario en infecciones comunes.
- Demostrar la actividad antibacteriana de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa) en formulaciones farmacéuticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barrientos S, Serna F, Díez H, Rodríguez A. Resistencia a la amoxicilina de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibioticoterapia previa y sin esta / Amoxicillin. Univ Odontol [Internet]. 25 de noviembre de 2017;34(72):101. Disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/14958>
2. Vásquez S, Lobos O, Padilla C. Presencia de genes de virulencia *gtfB* y *spaP* en *Streptococcus mutans* aislados desde saliva y su relación con el índice COPD y ceod. Rev clínica periodoncia, Implantol y Rehabil oral [Internet]. 2016;7(2):65-71. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/piro/v7n2/art04.pdf>
3. Organización Mundial de la Salud. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo [Internet]. OMS /Ginebra. World Health Organization; 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>
4. Galiana C. Bacterias en la Cavidad Oral: resistencia a AMOXICILINA???. Universidad Cardenal Herrera - España [Internet]. 2020 [citado 14 de julio de 2021]; Disponible en: <https://blog.uchceu.es/odontologia/bacterias-en-la-cavidad-oral-resistencia-a-amoxicilina/>
5. Triana Y. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE *Streptococcus mutans* A BETALACTÁMICOS EN UNA POBLACIÓN DE RIESGO A ENDOCARDITIS INFECCIOSA [Internet]. 2014. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8896/tesis831%281%29.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
6. Perú21. Ministerio de Salud: “El 90.4% de los peruanos tiene caries dental” Lima. 2019 [citado 12 de marzo de 2020]; Disponible en: <https://peru21.pe/lima/ministerio-salud-minsa-90-4-peruanos-caries-dental-489121-noticia/>
7. Rodríguez M. Frecuencia de Colonización Oral por *Streptococcus mutans* en

- Neonatos del Hospital Regional de Lambayeque, 2019 [Internet]. Universidad Señor de Sipan. Universidad Señor de Sipan; 2019. Disponible en: [https://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12802/7095/Rodríguez Silva María Rocío.pdf?sequence=1](https://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12802/7095/Rodríguez_Silva_María_Rocío.pdf?sequence=1)
8. Bonino J, Leguisamo E, Albanell S. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DE Nerium oleander EN OVINOS [Internet]. 2016. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/2720/1/FV-30328.pdf>
 9. Vasquez J. Adelfa: características, hábitat, cultivo, usos. [Internet]. Lifeder. 2020 [citado 5 de julio de 2021]. Disponible en: <https://www.lifeder.com/adelfa/>
 10. Graciano M, Correa Y, Martínez C, Burgos A, Ceballos J, Sánchez L. Streptococcus mutans y caries dental en América Latina. Revisión sistemática de la literatura. Rev Nac Odontol [Internet]. 2017;8(14):32-45. Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/od/article/view/282/293>
 11. Porte L, Braun S, Dabanch J, Egaña A, Andrighetti. D. Streptococcus mutans: Una bacteria que hace honor a su nombre. Rev Chil Infectol [Internet]. diciembre de 2015 [citado 22 de julio de 2020];26(6):571. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/246810774_Streptococcus_mutans_Una_bacteria_que_hace_honor_a_su_nombre
 12. Delgadillo J, Espinoza S, Campocónico C, Evaristo T, Cáceres L, Gómez D, et al. Presencia de Streptococcus Mutans Genotipo C en niños y adolescentes peruanos con caries. Odovtos - Int J Dent Sci [Internet]. 2018;20(3):121-9. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/odovtos/ijd-2018/ijd183k.pdf>
 13. Mohammed N, Kareem R. Evaluating the anti- Pseudomonas Aeruginosa Efficacy and Potential Cytotoxicity of Nerium Oleander Alcoholic Extract. Indian J Forensic Med Toxicol [Internet]. 2021;15(2). Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Nihad-Jaddoa/publication/351435755_Evaluating_the_anti-Pseudomonas_Aeruginosa_Efficacy_and_Potential_Cytotoxicity_of_Nerium

[_Oleander_Alcoholic_Extract/links/60975db2299bf1ad8d8954c5/Evaluating-the-anti-Pseudomonas-Aero](#)

14. Mouhcine M, Amin L, Saaid A, Khalil H, Laila B, Mohammed E. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities of Nerium oleander collected in Morocco. Asian Pac J Trop Med [Internet]. 2019;12(1):32-7. Disponible en: https://www.apjtm.org/temp/AsianPacJTropMed12132-4654551_125545.pdf
15. Bameta A, Kumari A, Upadhyaya A. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of Nerium oleander L. Int J Biol Res [Internet]. 2017;3(3):94-8. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/331165990_Phytochemical_analysis_and_antimicrobial_activity_of_Nerium_oleander_L
16. Chumacero P, León E. Efecto antibacteriano del extracto etanólico y metanólico de Nerium oleander (laurel rosa) sobre Escherichia coli. [Internet]. 2021. Disponible en: <http://50.18.8.108:8080/bitstream/handle/ROOSEVELT/516/TESIS PATCY y ERMITA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
17. Rojas R. EFECTO DEL DECOCTO DE Nerium oleander L. SOBRE LARVAS III DE Spodoptera frugiperda (SMITH & ABBOT) [Internet]. Universidad Nacional de Trujillo; 2019. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/12568>
18. Fernandez H. Uso del Laurel rosa (Nerium oleander) como rodenticida [Internet]. Universidad Nacional de Cajamarca; 2015. Disponible en: <https://1library.co/document/q7wj3xoz-uso-del-laurel-rosa-nerium-oleander-como-rodenticida.html>
19. Alan D, Cortez L. Procesos y fundamentos de la investigación científica [Internet]. Procesos y Fundamentos de la Investigación Científica. 2014. 1689-1699 p. Disponible en: http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/14232/1/Cap.4-Investigación_cuantitativa_y_cualitativa.pdf
20. Anonimo. El diseño de investigación experimental [Internet]. 2016. Disponible en: http://histologia.ugr.es/pdf/Metodologia_III.pdf

21. Alonso A, García L, León I, García E, Gil B, Ríos L. Métodos de investigación de enfoque experimental. En: Metodología de la investigación educativa [Internet]. 2016. p. 167-93. Disponible en: <https://www.postgradoune.edu.pe/pdf/documentos-academicos/ciencias-de-la-educacion/10.pdf>
22. Vega A, Maguiña J, Soto A, Lama J, Correa L. Estudios transversales. Rev la Fac Med Humana [Internet]. 2021;21(1):164-70. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rfmh/v21n1/2308-0531-rfmh-21-01-179.pdf>
23. MPCh. Diagnostico Urbano de Chiclayo. 2017;
24. Hernández C. y Carpio N. Introducción a los tipos de muestreo. Rev Científica del Inst Nac Salud «Alerta». 2019;2(1):75-9.
25. Montero M, Vayas L, Avilés D, Pazmiño P, Erazo V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*. Rev Investig Vet del Perú [Internet]. 2018;29(4):1543. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a52v29n4.pdf>
26. Taroco R. Seija V. Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. En: Temas de Bacterología y Virología Médica [Internet]. 2017. p. 663-71. Disponible en: <http://higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
27. Lock O. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales [Internet]. 2da edición. Universidad E de la PC del P, editor. 2000 [citado 1 de agosto de 2021]. 310 p. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=N36g2QOccXkC&printsec=frontcover&dq=estudios+fitoquímicos&hl=es-419&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
28. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition [Internet]. CLSI. 2020. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
29. Universidad de Salamanca. Antibiograma [Internet]. [citado 1 de agosto de 2020]. Disponible en:

http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html

30. Nodarse R. Lectura interpretada del antibiograma [Internet]. Revista Cubana de Medicina Militar. 2016 [citado 13 de septiembre de 2021]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572013000400012
31. Díaz V. Metodología de la Investigación Científica y Bioestadística [Internet]. 2da ed. RIL®, editor. Chile: Universidad Finis Terrae; 2010. 564 p. Disponible en: <https://www.digitaliapublishing.com/a/29778/metodologia-de-la-investigacion-cientifica-y-bioestadistica--2a-ed.->
32. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación [Internet]. 6ta ed. México, D.F.: Mc Graw Hill; 2014. Disponible en: https://periodicooficial.jalisco.gob.mx/sites/periodicooficial.jalisco.gob.mx/files/metodologia_de_la_investigacion_-_roberto_hernandez_sampieri.pdf

ANEXOS

Anexo A: Matriz de consistencia

Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Nerium oleander* L. (laurel rosa) frente a *Streptococcus mutans* ATCC N° 25175

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Presentará efecto antibacteriano “in vitro” el extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (laurel rosa) sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175?	Demostrar el efecto antibacteriano “in vitro” del extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa) sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175	El extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa) tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Presentará metabolitos secundarios con efecto antibacteriano el extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa)?	Realizar el estudio fitoquímico del extracto etanólico con efecto antibacteriano de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa)	El extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa) presenta diferentes metabolitos secundarios con efecto antibacteriano
¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa) será soluble en diferentes solventes?	Realizar pruebas de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa)	El extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa) presenta solubilidad frente a varios solventes
¿Presentará efecto antibacteriano in vitro el extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (laurel rosa) al 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175?	Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa) al 100% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175	El extracto etanólico de las hojas <i>Nerium oleander</i> L. (Laurel rosa) al 100% tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175

<p>¿Presentará efecto antibacteriano in vitro el extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander L.</i> (laurel rosa) al 75% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175?</p>	<p>Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander L.</i> (Laurel rosa) al 75% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175.</p>	<p>El extracto etanólico de las hojas <i>Nerium oleander L.</i> (Laurel rosa) al 75% tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175</p>
<p>¿Cuál será el efecto comparativo in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander L.</i> (laurel rosa) con Clorhexidina al 1% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175?</p>	<p>Comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander L.</i> (Laurel rosa) con Clorhexidina al 1% sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175</p>	<p>El extracto etanólico de las hojas <i>Nerium oleander L.</i> (Laurel rosa) tiene mayor efecto antibacteriano “in vitro” sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175 que la clorhexidina al 1%.</p>

Anexo B: Ficha de recolección de datos

Placa	Extracto etanólico de Nerium oleander L.		Grupos control	
	75%	100%	Negativo (etanol 96°)	Positivo (Clorhexidina 1%)
1	10,8	12,3	6,0	28,5
2	10,4	11,4	6,4	28,0
3	10,2	12,1	6,3	27,4
4	10,4	12,1	6,0	28,1
5	9,9	12,4	6,2	27,8
6	10,2	12,0	6,2	28,0
7	10,5	12,0	6,1	28,0
8	11,0	12,4	6,4	27,9
9	9,5	12,6	6,1	28,4
10	10,5	12,1	6,2	28,0
11	10,6	11,9	5,9	28,4
12	10,5	12,3	6,1	27,8
13	10,9	11,7	6,4	27,2
14	10,2	11,7	6,3	28,4
15	10,5	12,2	6,4	27,9

Anexo C: Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	N° DE ÍTEMS	VALOR
Extracto etanólico de las hojas de <i>Nerium oleander L.</i>	Solución pastosa obtenida por proceso físico que contiene metabolitos de la planta	Obtenido por medio de maceración con etanol y evaporación posterior	Concentraciones	100 75	Ordinal	3	%
Efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC N° 25175	Capacidad de inhibir o evitar el crecimiento de la bacteria	Determinación por medio de la medición del tamaño del halo de inhibición	Diámetro del halo de inhibición	≤ 8mm 8mm a 14mm 14mm a 20mm > a 20mm	Ordinal	4	Nula Sensible Medio Muy sensible

Anexo D: Constancia de identificación taxonómica

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

El Biólogo colegiado, certifica que la planta conocida como "LAUREL ROSA" proporcionado por los Bachilleres, ROSA MARITZA GELACIO CHISCOL y VICTOR HUGO VEGA CASTAÑEDA, Tesistas de la Universidad María Auxiliadora, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Nerium oleander L.* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: PLANTAE
División: MAGNOLIOPHYTA
Clase: MAGNOLIOPSIDA
Subclase: ASTERIDAE
Orden: GENTIANALES
Familia: APOCYNACEAE
Especie: *Nerium*
Especie: *Nerium oleander L.*

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


Lima, 05 de diciembre del 2021


Blgo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilner Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
C.M. 1779

Anexo E: Certificado de análisis de la cepa microbiológica



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0288 Lot Number: 288-28** Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2022/9/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2020/10/24
Performance	
Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the S3AP other is small, circular and translucent. Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and Gram Stain (1) predominately in chains	Medium: S3AP other is Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
<p><small>**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.</small></p> <p><small>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.</small></p> <p><small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="271 1276 478 1422">  ACCREDITED REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.82 </div> <div data-bbox="446 1422 1388 1467"> <small>(*) 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.</small> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="271 1500 478 1646">  ACCREDITED TESTING CERT #2655.01 </div> <div data-bbox="526 1624 893 1657"> <small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small> </div> </div>	

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 the 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.

Sample Name: Streptococcus mutans
 Sample Description: 0286
 Sample ID: 286-28
 Sample Creation Date/Time: 2018-10-19T10:55:23.331 CMC
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A2 (+++) (A)	286-28	Streptococcus mutans	2.15

Comments:

N/A

Anexo F: Evidencias del trabajo de campo



Figura 2. Recolección de la especie vegetal en la zona del distrito de Pimentel, Lambayeque, Latitud: 6° 50' 13" Sur Longitud: 79° 56' 10" Oeste m.s.n.m.



Figura 3. Lavado y desinfección de la especie vegetal



Figura 4. Secado de las hojas a temperatura ambiente, 23°C bajo sombra



Figura 5. Secado de las hojas en estufa (45°C)



Figura 6. Triturado manual y pulverizado de las hojas *Nerium oleander* L. (Laurel rosa)



Figura 7. Tamizado y maceración con etanol 96° de las hojas de *Nerium oleander* L.



Figura 8. Filtrado y evaporación del macerado de hojas de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa)



Figura 9. Extracto etanólico de las hojas *Nerium oleander L.*



Figura 10. Solventes según polaridad empleados en la prueba de solubilidad del extracto etanólico de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa)



Figura 11. Prueba de solubilidad del extracto etanólicos de *Nerium oleander L.* (Laurel rosa)



Figura 12. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Nerium oleander L.*



Figura 13. Activación de la cepa de *Streptococcus mutans ATCC 25175*



Figura 14. Preparación del inóculo de trabajo a escala 0.5 MacFarland



Figura 15. Sembrado en placas de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Figura 16. Aplicación de los extractos e incubación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Figura 17. Medición de los halos de inhibición sobre fondo oscuro con Vernier digital

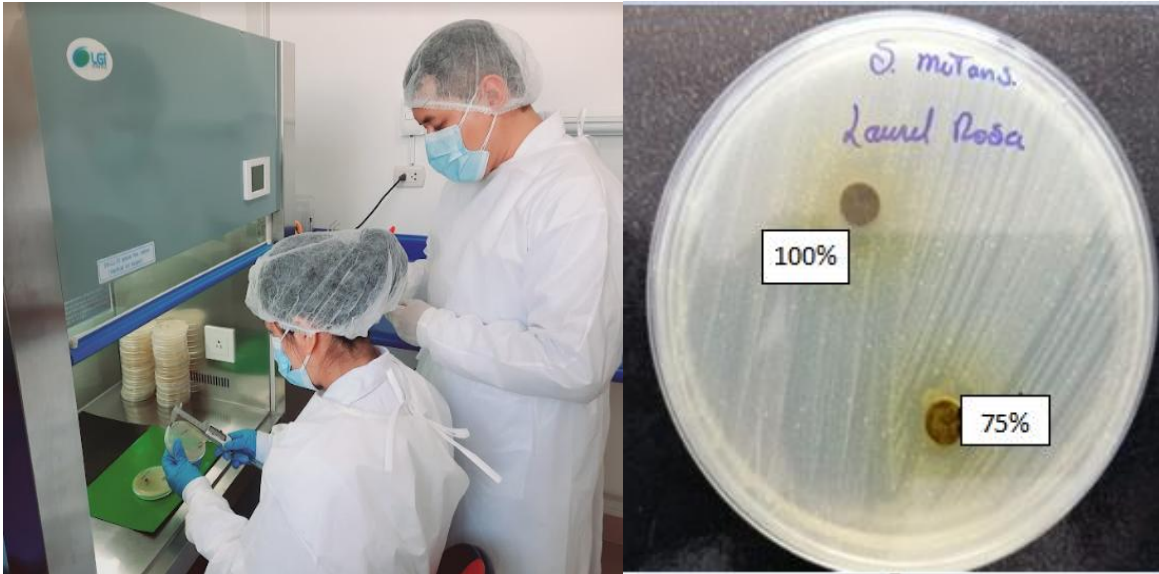


Figura 14. Efecto inhibitorio obtenido mediante halos de inhibición. Derecha: medición de halos en fondo verde. Izquierda: Halos de inhibición