

# UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSTGRADO

SECCIÓN DE POSTGRADO DE MEDICINA



**EFEECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC**

**25175**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA**

**AUTOR:**

Br. Víctor William Cerna Chuquipoma

**ASESOR:**

Dr. José Guillermo González Cabeza.

**Trujillo - 2016**

**N° de Registro-----**

# UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

ESCUELA DE POSTGRADO

SECCIÓN DE POSTGRADO DE MEDICINA



**EFEECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) FRENTE A *Streptococcus mutans* ATCC**

**25175**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA**

**AUTOR:**

Br. Víctor William Cerna Chuquipoma

**ASESOR:**

Dr. José Guillermo González Cabeza.

**Trujillo - 2016**

**N° de Registro-----**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis magistral está dedicada a mi hermosa familia y a los amigos que siempre me ha acompañada en el transcurso de la vida. A mi asesor de tesis y laboratorio Dr. Jose Gonzalez y Tc. Alex Terán, mi profesor Dr. Weyder Portacarrero, que hicieron posible este logro, sin olvidar a Dios por tanta bendición.

## **AGRADECIMIENTOS**

Muchos viven buscando la felicidad, recordemos que la felicidad no se busca se tiene, dejamos de trabajar por algo que realmente tenemos sin buscar lejos, aprendamos a disfrutar cada instante de la vida sea bueno o malo, somos la esencia de como asimilemos la vida.

Le estoy muy agradecido al Señor por haber guiado mi carrera, por ser mi fortaleza en mis flaquezas y enseñarme día a día la superación.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que me gustaría agradecerles su amistad y compañía en los momentos más felices como en los difíciles. Algunas están presentes y otras en mi corazón. Quiero darles las gracias por formar parte de mí y por todas sus bendiciones. Agradezco de corazón a mis familiares, esposa, amigos, y docentes; que hoy hacen posible presentarme ante ustedes para obtener el grado de magister.

Gracias.

## RESUMEN

La presente investigación experimental prospectivo transversal tiene como objetivo evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Para el experimento se utilizaron diferentes concentraciones de aceite esencial *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa): **5%; 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.312%; 0.078%; 0.039%** a los que se le inoculó 0.1ml *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se evaluó la CMI por medio de la espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm; y CMB mediante la observación del crecimiento de colonias. Los datos para la CMI fueron procesados con la pruebas no paramétricas; Kruskal-Wallis para evaluar la concentración inhibitoria mínima del aceite y complementada con la prueba de Dunn para determinar la concentración inhibitoria mínima. El análisis no paramétrico también fue realizado para determinar la concentración mínima bactericida. El resultado de CMI y la CMB fue de 1.25%, atribuyéndole al citral que contiene el *Cymbopogon citratus*, como posible efecto antibacteriano frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## PALABRAS CLAVE

*Streptococcus mutans*, *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), efecto antibacteriano

## ABSTRACT

This prospective cross-experimental research aims to evaluate the in vitro antibacterial effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) against *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

For the experiment different concentrations of essential oil *Cymbopogon citratus* (lemongrass) were used: 5%; 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.312%; 0.078%; 0.039% that was inoculated with *Streptococcus mutans* ATCC 25175 0.1ml. CMI was evaluated by spectrophotometry at a wavelength of 620 nm; and CMB by observing the growth of colonies.

Data for CMI were processed with the nonparametric tests; Kruskal-Wallis test to assess the minimum inhibitory concentration of oil and complemented by Dunn's test to determine the minimum inhibitory concentration. The nonparametric analysis was also performed to determine the minimum bactericidal concentration. The result of CMI and the CMB was 1.25%, attributing the citral containing *Cymbopogon citratus* as a possible antibacterial effect against *Streptococcus mutans* ATCC 25175

## KEY WORDS

*Streptococcus mutans*, *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), antibacterial effect.

## INDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN .....	10
1. Formulación del problema.....	14
2. Hipótesis de investigación.....	14
3. Objetivos de investigación .....	14
3.1 General.....	14
3.2 Específicos .....	14
II. DISEÑO METODOLÓGICO.....	15
1. Material de estudio .....	15
1.1 Tipo de investigación.....	15
1.2 Área de estudio .....	15
1.3 Definición de la población muestral .....	16
1.3.1 Características generales: .....	16
1.3.1.1 Criterios de inclusión: .....	16
1.3.1.2 Criterios de exclusión: .....	16
1.3.1.3 Criterios de eliminación .....	17
1.3.2 Diseño estadístico de muestreo .....	17
1.3.2.1 Unidad de Análisis: .....	18
1.3.2.2 Unidad de muestreo: .....	18
1.3.2.3 Tamaño muestral .....	19
1.3.3 Métodos de selección .....	19
2. Métodos, Procedimiento e Instrumento de recolección de datos .....	19
2.1. Método .....	19
2.2. Descripción del procedimiento .....	19
2.3. Instrumento de Recolección de Datos .....	26

3. Variables y operativización de variables .....	27
4. Análisis Estadístico e Interpretación de la Información .....	28
III. RESULTADOS .....	29
IV. DISCUSION .....	34
V. CONCLUSIONES .....	37
VI. RECOMENDACIONES .....	38
VII. REFERENCIAS .....	39



## INDICE DE CUADROS

<b>DEL DISEÑO METODOLÓGICO .....</b>	<b>15</b>
Tipo de investigación .....	15
Variables y operativización de variables .....	24
 <b>RESULTADOS</b>	
Tabla N° 01: Concentración mínima inhibitoria <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (Hierba luisa) frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	30
Tabla N° 02: Concentración mínima bactericida <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa) frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 .....	31
Grafico N° 01: Concentración mínima inhibitoria <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (Hierba luisa) frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.....	32
Grafico N° 02: Concentración mínima bactericida <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa) frente al <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 .....	33
Anexo 01: Calibración .....	47
Anexo 02: Recolección de datos CMI.....	47
Anexo 03: Recolección de datos CMB .....	48
Anexo 04: Prueba de normalidad .....	49
Anexo 05: Prueba de Kruskal-Wallis y prueba de Duncan. ....	51

## I. INTRODUCCION

La cavidad oral alberga innumerables microorganismos en un ecosistema de complejidad considerable; estos constituyen la flora oral del ser humano, la cual es altamente diversa y son parte importante en la salud como en la enfermedad oral; por lo tanto es vital buscar nuevas sustancias para ayudar a controlar la proliferación de estos microorganismos.<sup>1</sup>

El *Streptococcus mutans* es habitante normal de la cavidad oral y es considerado uno de los principales factores etiológicos de la caries dental en humanos, en el que los ácidos carboxílicos de cadena corta liberados como su fermentación subproductos desmineralizan el esmalte y provocan cavitación en el diente. Es anaerobio facultativo y puede sintetizar glucano a partir de sacarosa, lo que le permite adherirse a superficies duras, es acidogénico y tiene la capacidad de sobrevivir a un pH muy bajo por largo tiempo, manteniendo su pH interno estable. Entre sus características fundamentales está su capacidad de mutar, de allí que se puede encontrar en forma de bacilo o coco.<sup>2-7</sup>

Por consiguiente, el hecho de reconocer a *Streptococcus mutans* como el microorganismo más importante en la iniciación de la caries, conduce a diseñar medidas de prevención dirigidas hacia la eliminación o disminución de éste, en la cavidad oral. Al respecto, se han planteado diferentes estrategias: Control inmunológico, control microbiológico, educación sanitaria, control de la dieta, detección previa de factores de riesgo, higiene bucodental, ingestión y aplicación de

fluoruros, aplicación de sellantes de puntos y fisuras, ingestión y aplicación de fármacos.<sup>8,2,4,9</sup>

Entre las más antiguas actividades del ser humano está el estudio de plantas. Siempre, el hombre se vio en la necesidad de hacer la distinción entre aquellas plantas que eran venenosas y las que no lo eran, adquiriendo así un amplio conocimiento sobre aquellas que poseían propiedades medicinales, que fue transmitiendo a través del tiempo. Muchas especies son estudiadas con frecuencia para hallar en ellas su posible valor farmacológico, en especial por sus propiedades antipiréticas, antibacterianas, astringentes, fungicidas, antibióticas, entre las plantas reconocidas por sus comprobadas propiedades medicinales se encuentra la Hierba luisa (*Cymbopogon citratus*).<sup>10-12</sup>

La hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) es una especie tropical perteneciente a la familia de las Gramineas, robusta, tallos muy ramificados de 80 a 100 cm de alto con los nudos ceríferos. La planta crece en macollos compactos, formados por muchos tallos cortos que salen de rizomas pequeños. Hojas aromáticas, las hojas tienen entre 30 y 100 cm de largo y 1 a 1.5 cm de ancho, con bordes duros y el nervio central fuerte, sus ramas alargadas y un tanto pendulazas y los racimos bifurcados. No florece o lo hace muy rara vez. La parte utilizable por la industria está constituida por las hojas y los tallos tiernos tiene alrededor de setenta especies ninguna de ellas originaria del Perú pero adaptables a regiones tropicales como nuestro país. Crece adecuadamente en una gama de suelos, pero su mayor productividad se da en los suelos fértiles de textura media a ligera (franco a franco arenoso) y con buena capacidad retentiva de agua. En los suelos arenosos se tiene

mayor producción de follaje pero menor aceite esencial. No tolera las condiciones de mal drenaje. Desarrolla bien en zonas con temperatura media entre 22 y 28° C. Se encuentra en áreas con precipitaciones pluviales en el rango de 1,500 a 4,000 mm<sup>3</sup>/año con lluvias bien distribuidas. Es reconocida como una planta medicinal, siendo la infusión hecha de sus hojas popularmente utilizada como antiespasmódico, sedantes antiinflamatorio y analgésico.<sup>13-28</sup>

Posee como metabolismo secundario el aceite esencial, destacando los monoterpenos oxigenados, siendo el citral el de mayor cantidad (65-85%) el cual es químicamente conocido como 3,7 dimetil 2,6 octadienal. Encontraremos además sustancias no volátiles, entre las cuales se pueden mencionar flavonoides, ácido cafeico, fructuosa y sacarosa. Entre los componentes volátiles, terpenos como el geraniol y citronelol.<sup>29-34</sup>

Los aceites esenciales (A.E) pueden definirse como mezclas de compuestos orgánicos volátiles los cuales producen el aroma de muchas de las sustancias vegetales. Ellos son utilizados en diversas industrias ya sea la industria alimenticia, la cosmética y la farmacéutica.<sup>35,36</sup>

El aceite esencial de la Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) gracias a su alta volatilidad y lipofilia puede penetrar fácilmente y ejercer su efecto biológico a nivel de la membrana celular, donde altera su estructura provocando fugas y muerte celular, bloqueando la síntesis de membrana, inhibiendo la germinación de esporas y la respiración celular .<sup>37</sup>

Se han reportado muy pocos estudios que tienen por objetivo el determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de la *Cymbopogon citratus*, y muy pocos estudios de la efectividad de las plantas medicinales frente a *Streptococcus mutans*.

Borja F.<sup>12</sup> (2007), Evaluaron la actividad antibacteriana de *Cymbopogon citratus* a través del método de difusión en agar y a su vez hallaron la CMI mediante el método de microdilución frente a *Streptococcus mutans*. Se encontró que la CMI fue de 0.4%. y los halos de inhibición de 21,8mm y 23mm en 80ul/ml y 160ul/ml del aceite esencial. Concluyendo que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* es un buen agente antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*.

Por este motivo, la presente investigación aportará el sustento científico al uso terapéutico de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) y sus propiedades antibacterianas, como alternativas de solución para enfermedades originadas por la presencia del *Streptococcus mutans*; es por ello la importancia de determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## 1. Formulación del problema

¿Existe efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

## 2. Hipótesis:

El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## 3. Objetivos:

### 3.1 Objetivo General.

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

### 3.2 Objetivos Específicos.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Determinar la concentración mínima bactericida *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175

## II. DEL DISEÑO METODOLÓGICO

### 1. Material de estudio.

#### 1.1 Tipo de investigación.

Según el período en que se capta la información	Según la evolución del fenómeno estudiado	Según la comparación de poblaciones	Según la interferencia del investigador en el estudio
Prospectiva	longitudinal	Comparativa	Experimental

#### 1.2 Área de estudio.

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada Antenor Orrego, distrito de Trujillo, Departamento de La Libertad, Perú.

#### 1.3 Definición de la población muestral:

##### 1.3.1 Características Generales:

- Conjunto de tubos de ensayo con la macrodilución de caldo LB (Luria Bertani) del microorganismo de prueba: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y la concentración de aceite esencial de *Cymbopogon Citratus* (Hierba Luisa) correspondiente.
- Conjunto de placas Petri con medio de cultivo TSA (Agar Tripticasa de Soya) del microorganismo de prueba: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y la concentración de

aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) correspondiente.

#### **1.3.1.1 Criterios de inclusión**

- Tubo de ensayo con la macrodilución de caldo LB (Luria Bertani) de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) a la concentración correspondiente.
- Placa Petri con medio de cultivo TSA (Agar Tripticasa de Soya) del microorganismo de prueba: *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y la concentración de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) correspondiente.

#### **1.3.1.2 Criterios de exclusión**

- Tubo de ensayo con la macrodilución que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Tubo de ensayo con la macrodilución cuyo resultado en el proceso de incubación pueda ser dudoso.
- Placa Petri con medio de cultivo que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Placa Petri con la medio de cultivo cuyo resultado en el proceso de incubación pueda ser dudoso.



### **1.3.1.3 Criterios de eliminación**

- Tubo de ensayo con la macrodilución que sufra deterioro, daño o rajadura durante la conservación y los procedimientos que no permitan su medición posterior.
- Placa Petri con medio de cultivo que sufra deterioro, daño o rajadura durante la conservación y los procedimientos que no permitan su medición posterior.

## **1.3.2 Diseño estadístico de muestreo**

### **1.3.2.1.Unidad de análisis**

#### **1.3.2.1.1. Para la concentración mínima inhibitoria.**

Cada uno de los tubos de ensayo con la macrodilución de caldo LB (Luria Bertani) de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) a la concentración correspondiente.

#### **1.3.2.1.2. Para la concentración mínima bactericida.**

Cada uno de las placas Petri con medio de cultivo TSA (Agar Trypticasa de Soya) de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) a la concentración correspondiente.

### 1.3.2.2.Unidad de muestreo

#### 1.3.2.2.1. Para la Concentración Mínima Inhibitoria.

Cada uno de los tubos de ensayo con la macrodilución de caldo Luria Bertani de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) a la concentración correspondiente.

#### 1.3.2.2.2. Para la Concentración Mínima Bactericida.

Cada uno de las placas petri con medio de cultivo TSA (Agar Tripticasa de Soya) de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) a la concentración correspondiente.

### 1.3.2.3.Tamaño de muestra.

Para determinar el tamaño muestral se empleó la fórmula que corresponde a comparación de medias.<sup>38</sup>

$$n = \frac{2 * \left( \frac{Z_{\alpha}}{2} + Z_{\beta} \right)^2 * \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Dónde:

n	Tamaño de la muestra
$Z_{\alpha/2}=1.96$	Valor Z al 5% de error tipo I
$Z_{\beta}= 1.645$	Valor Z al 5% de error tipo II
$\sigma=0.274$	Desviación estándar de la absorbancia al 50% de concentración de Hierba Luisa, estimada por muestra piloto.

$\mu_1=0.601$  Absorbancia promedio al 50% de concentración de Hierba Luisa, estimada por muestra piloto.  
 $\mu_2=0.205$  Absorbancia promedio al 25% de concentración de Hierba Luisa, estimada por muestra piloto.

Reemplazando se tiene:

$$n = \frac{2 * (1.96 + 1.645)^2 * 0.274^2}{(0.601 - 0.205)^2}$$

n= 13.

La muestra total estará constituida por 140 muestras, 20 para cada uno de los 7 grupos experimentales y 2 controles en cada repetición positivos y negativos.

### **1.3.3 Método de selección:**

La selección de la muestra se realizó a través de un método no probabilístico, a conveniencia del investigador hasta completar el número requerido.

## **2. Método, técnicas e instrumento de recolección de datos.**

### **2.1 Método:**

Observación.

### **2.2 Descripción del procedimiento:**

#### **A. De la aprobación del proyecto:**

Para iniciar el presente estudio de investigación, se obtuvo el permiso para su ejecución; tras la aprobación del proyecto por el Comité Permanente de Investigación Científica de la Escuela de

Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego, con la correspondiente Resolución Decanal.

**B. De la autorización para la ejecución:**

Una vez aprobado el proyecto, se solicitó el permiso para poder ejecutar el trabajo en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada Antenor Orrego.

**C. Resultados de la calibración**

Para dar mayor confiabilidad del estudio se procedió a la calibración del experto (Microbiólogo) en lecturas del espectrofotómetro e inspección visual de placa Petri; luego se calibró al investigador con los mismos instrumentos.

Anexo 01

**D. Validación del instrumento de medición**

En este caso el Espectrofotómetro (Thermo Modelo – Genesys 6) según el fabricante es un instrumento con validez y confiabilidad.

**E. Resultados de la confiabilidad**

Se evaluó la confiabilidad del instrumento de medición; el investigador se calibró consigo mismo (calibración intraevaluador) y con un experto en el tema (calibración interevaluador). Para dichas calibraciones se realizaron la lectura mediante

espectrofotometría de 10 tubos de ensayos y mediante inspección visual de 10 placas Petri entre el investigador y el experto.

Para la calibración intraevaluador el investigador recibió una capacitación previa en el uso del instrumento de medición, brindada por el experto (Microbiólogo) y luego se realizó dos observaciones del mismo grupo de tubos de ensayo y placas petri, la segunda observación se realizó una semana después de la primera y se empleó el coeficiente de correlación de intraclase para evaluar la concordancia.

Para la calibración interevaluador tanto el investigador como el experto realizaron una observación del mismo grupo de tubos de ensayo y de placas Petri empleándose el coeficiente de correlación de interclase para evaluar la concordancia entre ambas observaciones.<sup>39</sup>

Anexo 01

#### **F. Obtención de la cepa:**

En el presente estudio se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, la cual será obtenida del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias y en la Unidad de Ciencias Biomédicas de la Universidad Privada Antenor Orrego. La cepa en estudio fue transportada y conservada en el medio que la expide el laboratorio hasta su correspondiente activación.

**G. De la preparación del inóculo:**

A partir del cultivo liofilizado de la cepa señalada, fue reactivada en caldos de cultivos Luria Bertani. La muestra reactivada fue incubada a 37°C/48 horas y bajo condiciones de anaerobiosis.

**H. Del cultivo de la cepa:**

Una vez evaluado los cultivos se seleccionaron aquellos en los que se evidenciaba el mejor crecimiento y por ende el más óptimo, posteriormente se procedió a sembrar en Agar Tripticasa Soya (TSA) e incubados a 37°C/48 horas con la finalidad de obtener placas master, las cuales sirvieron como fuente biológica para las experiencias cotidianas.

De las placas master, se tomaron 2-3 colonias y fueron sembradas en caldo Luria Bertani, e incubados durante 24 a 48 horas bajo condiciones de anaerobiosis procediéndose de esa manera al overnight cultivo que será empleado en los distintos ensayos.

**I. Obtención del aceite esencial de *Cymbopogon citratus***

**Recolección de la planta de Hierba Luisa:**

Se emplearon *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) en estado óptimo de desarrollo (vegetativo, floración o fructificación), las hojas fueron recolectadas de las chacras del distrito de Guadalupe pertenecientes al valle de Jequetepeque en el mes de febrero.

### **Selección de la planta de Hierba Luisa:**

Con la supervisión del Museo de historia natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego se realizó la selección de las hojas y se eliminó las que no se mostraban aptas para su procesamiento.

Las hojas recolectadas fueron liberados de la tierra silíceo y se seleccionaron sólo aquellas hojas que presentaron condiciones favorables para el estudio (máxima fructificación – Antesis: Los órganos reproductivos han llegado a su máximo desarrollo). Se descartaron aquellos con características desfavorables.

### **Preparación de la planta de Hierba Luisa:**

Se procedió a la limpieza de las hojas escogiéndolos a fin de que estén libres de sustancias extrañas para su posterior tratamiento, luego se dejó secar bajo sombra hasta obtener las muestras secas seguidamente fueron molidos y tamizados hasta obtener partículas pequeñas.

### **J. Obtención de las diluciones:**

El aceite de hierba luisa se obtuvo mediante el método de hidrodestilación durante 1 hora. La fracción de aceite esencial extraída se recolecto en un vial, para congelarlo a -10 °C y luego se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos, con el fin de separar la fase acuosa de la oleosa. Siendo diluido al **5%; 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.312%; 0.078%; 0.039%** dichas diluciones se almacenaron en frascos oscuros a 4°C para los análisis posteriores.

**J. Del efecto antibacteriano:**

Se determinó a través de:

Concentración Mínima Inhibitoria.

Concentración Mínima Bactericida.

**De la Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria:**

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante la técnica de macrodilución en caldo Luria Bertani en la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

La macrodilución se dividió en 7 grupos y dos controles (positivo y negativo) según cada concentración del aceite de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) (5%; 2.5%; 1.25%, 0.625%; 0.312%; 0.078%; 0.039%) a cada una de estas concentraciones que contienen caldo LB se le adicionó 0.1 mL (100 ul) del inóculo luego se dejaron incubar a 37°C por un periodo de 48 horas en condiciones de anaerobiosis y agitación continua con la finalidad de homogenizar de manera adecuada el aceite; de estos ensayos se realizaron 20 repeticiones obteniéndose 20 lecturas por cada concentración; paralelamente se realizó un blanco por cada tubo (Caldo Luria Bertani, Cepa y concentraciones de aceite respectivamente) los cuales fueron leídos a las cero horas mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 620 nm la misma que fue aplicada para aquellos tubos que se dejaron incubar por 48 horas; estos blancos juntamente con los controles positivo



y negativo (Positivo = Luria Bertani + cepa de *Streptococcus mutans*), (negativo = Caldo Luria Bertani + aceite esencial) referente al crecimiento microbiano el cual nos permitieron obtener lecturas corregidas y a la vez permitió analizar mejor los resultados facilitándose la determinación de la concentración mínima inhibitoria.

#### **La Concentración Mínima Bactericida:**

Para determinar esta concentración se realizaron siembras en placas de agar TSA a partir de las diluciones empleadas para la CMI; Estas placas fueron incubadas a 37°C por un periodo de 48 horas y bajo condiciones de microanaerobiosis.

Pasado este tiempo se evaluó el crecimiento microbiano con la finalidad de determinar aquella concentración en la cual el microorganismo no se ha desarrollado; esto nos permitió determinar cuál es la mínima concentración de *Cymbopogon citratus* que mata al *Streptococcus mutans*.

#### **K. De la verificación de los resultados.**

Después de obtener todos los datos se procedió a la verificación de los mismos con los frascos rotulados, para luego transferir los datos para el respectivo análisis estadístico.

### **2.3 Instrumento de recolección de datos:**

Los datos obtenidos en la investigación se registraron en fichas elaboradas por el autor (Anexo N°2 y N°3). La cual consignará la absorbancia expresada en longitud de onda (620nm) mediante espectrofotometro y la inspección visual de evidencia de crecimiento unidades formadoras de colonia (UFC)

### 3. Variables

Variables	Definición Conceptual	Definición Operacional (Indicadores)	Dimensiones	TIPO		Escala de Medición
				Según la Naturaleza	Según su Función	
<b>Aceite esencial de Cymbopogon Citratus (Hierba Luisa)</b>	Producto químico biosintetizado <i>Cymbopogon Citratus</i> (Hierba Luisa), que es una <u>especie</u> de <u>planta</u> . <sup>40</sup>	Se medirá según la designación de la concentración utilizada: <b>5%</b> <b>2.5%</b> <b>1.25%</b> <b>0.625%</b> <b>0.312%</b> <b>0.078%</b> <b>0.039%</b> y Control	-----	Cualitativa	Independiente	Ordinal
<b>Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i></b>	Capacidad de una sustancia natural o química sintetizada parcial o totalmente en laboratorio que es capaz de inhibir el crecimiento o matar el <i>Streptococcus mutans</i> . <sup>4</sup>	Concentración Mínima Inhibitoria	Absorbancia expresada en longitud de onda (620nm)	Cuantitativa	Dependiente	De razón
		Concentración Mínima Bactericida	Observación del crecimiento bacteriano  No existe crecimiento: Negativo(-)  Existe crecimiento : Positivo(+)	Cualitativa		Ordinal

#### **4. Análisis estadístico e interpretación de la información**

Los datos fueron almacenados en una base de datos en EXCEL y procesados al software estadístico IBM SPSS Statistics versión 23.

Los resultados fueron presentados en tablas y gráficos de cajas elaborados en Minitab 17. En las tablas se presentaron las medias, medianas y desviaciones estándar del crecimiento bacteriano en UFC.

El análisis estadístico comprendió inicialmente análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la concentración inhibitoria mínima del aceite esencial (5%, 2.5%, 1.25%, 0.625%, 0.312%, 0.078% y 0.039%), complementándose con la prueba de Duncan prueba Post Hoc para determinar la concentración inhibitoria mínima. Sin embargo, debido al incumplimiento de los supuestos básicos de normalidad y homogeneidad de varianzas, los análisis anteriores fueron descartados. Finalmente, se recurrió a la prueba de Kruskal-Wallis en reemplazo del ANOVA y a la prueba de Dunn como análisis Post Hoc, en pruebas no paramétricas que no requieren de los supuestos anteriores. El análisis no paramétrico también fue realizado para determinar la concentración mínima bactericida

La significancia será considerada al 5%

### III. RESULTADOS

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El presente estudio se realizó en el Laboratorio Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada Antenor Orrego, con una muestra de 20 repeticiones para cada una de las siete concentraciones del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) para determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) y 20 repeticiones para determinar la concentración mínima bactericida (CMB). Obteniéndose los siguientes resultados:

El aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) presentó efecto antibacteriano *in vitro* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, expresado a través de la concentración inhibitoria mínima (CMI), mediante la determinación de la absorbancia expresada en longitud de onda (nm) en cada una de los tubos de ensayo y la concentración mínima bactericida mediante la observación del crecimiento bacteriano en cada una de las placas Petri.

La concentración inhibitoria mínima (CMI) del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) fue de 1.25%. TABLA 1, GRAFICO 1.

La concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) fue de 1.25%. TABLA 2, GRAFICO 2.

TABLA 1

Concentración mínima inhibitoria *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Concentración	Concentración mínima inhibitoria					
	Media (620nm) <sup>1</sup>	Desviación estándar	ANOVA: p <sup>2</sup>	Rango medio <sup>3</sup>	Test de Kruskall-Wallis p <sup>4</sup>	
5%	-0.0357 a	0.2551	0.000	58.500	ab	
2.5%	-0.0236 a	0.1043		41.500	ab	
1.25%	-0.0504 a	0.0068		33.775	a	
0.625%	0.0887 b	0.0083		65.500	ab	0.000
0.312%	0.1000 b	0.0232		74.100	bc	
0.078%	0.1321 b	0.0154		101.275	cd	
0.039%	0.1471 b	0.0067		118.850	d	
Control negativo	0					
Control positivo	0.180					

<sup>1</sup> Prueba de Duncan: concentraciones con letras diferentes indican diferencia entre ellas

<sup>2</sup> ANOVA: p<0.05 indica diferencias entre algunas concentraciones

<sup>3</sup> Prueba de Dunn: concentraciones con letras diferentes indican diferencia entre ellas

<sup>4</sup> Test de Kruskall-Wallis: p<0.05 indica diferencia entre algunas concentraciones

El Test de Kruskall-Wallis demuestra que la CMI es al 1.25%, donde el valor de  $p < 0.0504$ , encontrando también significancia también al 2.5% y 5% de la concentración del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175

TABLA 2

Concentración mínima bactericida *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*  
(hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Concentración	Rango medio <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
5%	30.50 a	0.000
2.5%	30.50 A	
1.25%	30.50 A	
0.625%	100.50 B	
0.312%	100.50 B	
0.078%	100.50 B	
0.039%	100.50 B	

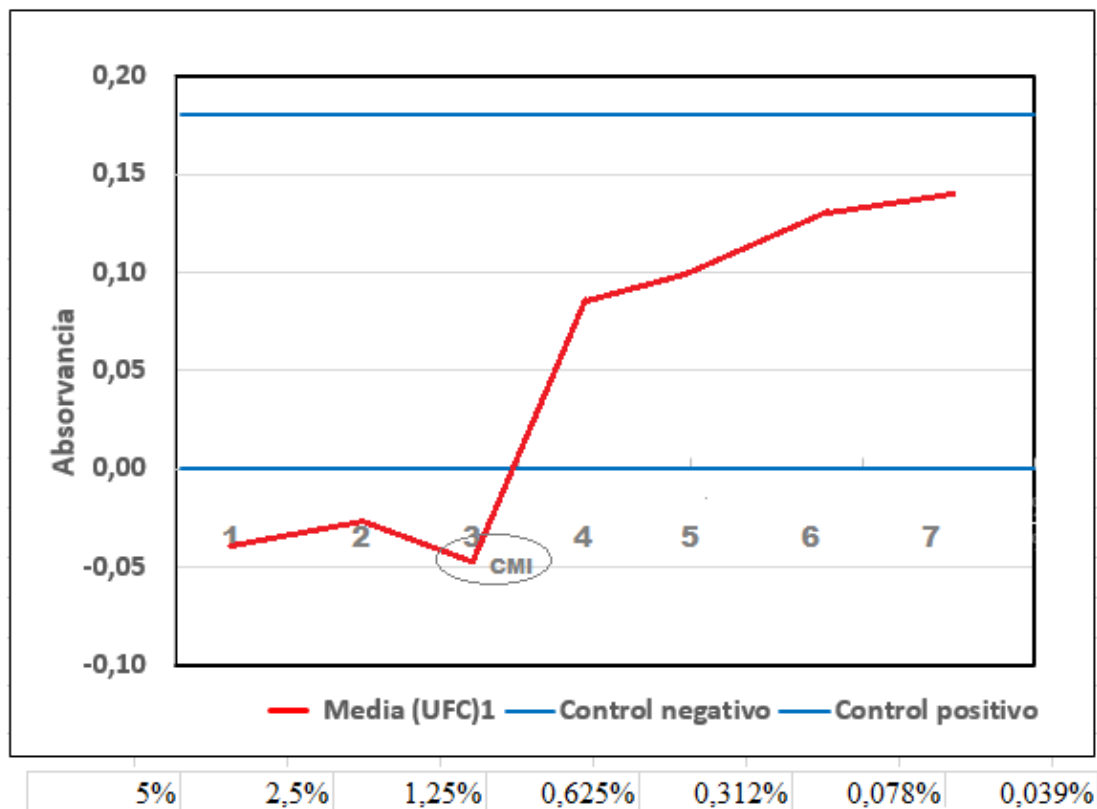
<sup>1</sup>Prueba de Dunn: concentraciones con letras diferentes indican diferencia entre ellas

<sup>2</sup> Test de Kruskal-Wallis:  $p < 0.05$  indica diferencia entre algunas concentraciones

Tanto en la Prueba de Dunn como la prueba de Kruskal - Wallis se muestra que hay diferencia significativa entre las diferentes concentraciones utilizadas del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Y en donde se observa la CMB al 1.25%.

### GRÁFICO 1

Concentración mínima inhibitoria in vitro del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175

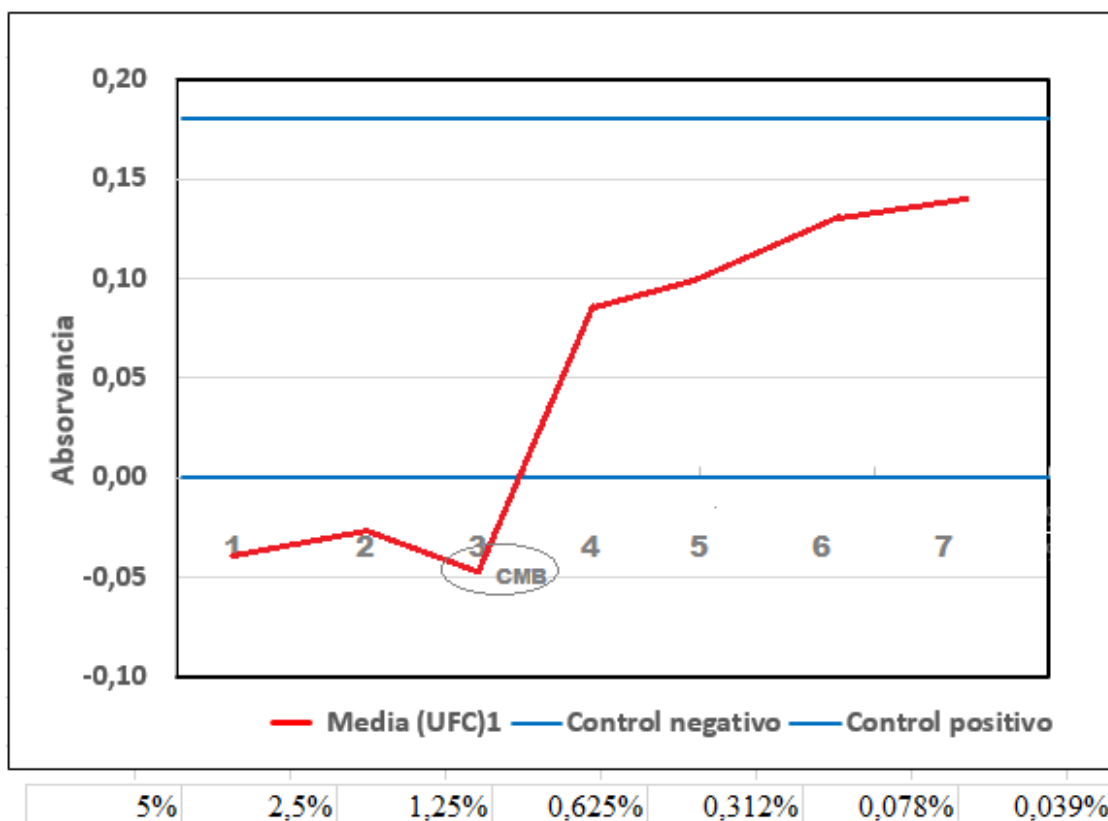


Mediante la prueba de espectrofotometría se pudo determinar la concentración mínima inhibitoria al 1.25% del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175



## GRÁFICO 2

Concentración mínima bactericida *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Mediante el crecimiento microbiano en las placas Petri, se observó que la concentración mínima bactericida es 1.25% del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175

#### IV. DISCUSIÓN

El *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa), es una planta que ha demostrado tener propiedades antibacterianas. El propósito de este estudio fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

El aceite esencial de la Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*) gracias a su alta volatilidad y lipofilia puede penetrar fácilmente y ejercer su efecto biológico a nivel de la membrana celular, donde altera su estructura provocando fugas y muerte celular, bloqueando la síntesis de membrana, inhibiendo la germinación de esporas y la respiración celular.<sup>39</sup>

En el presente estudio los resultados revelaron que el aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC25175. Este efecto podría deberse a que dentro de la composición química destaca un alto contenido del Citral (65-85%), además de sustancias no volátiles como flavonoides, ácido cafeico, fructuosa, sacarosa y componentes volátiles, terpenos como el geraniol y citronelol, a los cuales se les atribuye el efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.<sup>31-36</sup>

Las concentraciones mayores a 1.25% de aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) (2.5%, 5%) no presentaron crecimiento bacteriano, es decir a medida que aumenta la concentración del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) presenta mayor efecto antibacteriano; caso contrario a las concentraciones

menores a 1.25% (Hierba Luisa) (0.625%; 0.312%; 0.078%; 0.039%) los cuales evidenciaron crecimiento microbiano.

Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) fueron iguales a 1.25 %. Se observa coincidencia en los resultados obtenidos debido a las distancias entre cada una de las concentraciones, en la presente investigación se trabajó al doble de dilución. La concentración mínima inhibitoria es aquella concentración en la cual ya no se evidencia crecimiento bacteriano por lo tanto se define el mismo valor por que el crecimiento bacteriano es muy elevado en la próxima concentración, debido a esto no se podría llamar un crecimiento mínimo.

Borja F.<sup>13</sup> (2007), Evaluaron la actividad antibacteriana de *Cymbopogon citratus* a través del método de difusión en agar y a su vez hallaron la CMI mediante el método de microdilución frente a *Streptococcus mutans*. Se encontró que la CMI fue de 0.4% del aceite esencial. Concluyendo que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* es un buen agente antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*; que al contrastarlo con nuestro estudio donde obtuvimos 1.25% como CMI, pudimos evidenciar que la investigación de Borja no especifica la cepa de *Streptococcus mutans* con la que realizó su investigación; por tanto podemos presumir que este factor es responsable de la diferencia de resultados.

Por este motivo, la presente investigación aportará el sustento científico al uso terapéutico de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa) y sus propiedades antibacterianas, como alternativas de solución para enfermedades originadas por la presencia del *Streptococcus mutans*; es por ello la importancia de determinar el efecto

antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba luisa)  
frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

## V. CONCLUSIONES

Al determinar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se encontró que:

1. El aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) posee efecto antibacteriano in vitro sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. La concentración inhibitoria mínima (CIM) del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) fue 1.25%.
3. La concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (hierba Luisa) fue de 1.25%

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Ejecutar investigaciones utilizando concentraciones menores a 1.25 % para así encontrar una concentración mínima bactericida menor a la que se encontró en el estudio.
2. Continuar con las investigaciones utilizando concentraciones menores a 1.25 % para así encontrar una concentración mínima inhibitoria menor a la que se encontró en el estudio.
3. Llevar a cabo un estudio fitoquímico para poder aislar e identificar los principios activos de la Hierba luisa.
4. Realizar investigaciones a nivel nacional, para poder determinar mediante ellas, cuáles son las especies propias del país que puedan tener mayor efecto antibacteriano.

## VII. REFERENCIAS

1. Mayta F, Sacsquispe S. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Rev Estomatol Herediana. 2010; 20(1):19-24.
2. Gamboa F, Herazo B. Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica. Universitas Scientiarum 2004;(9)45-55.
3. Adriana N, Martha R, Nidia S. Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. Rev Cubana Plant Med. 2005;(10) 3-4.
4. Burnet G. Microbiología oral y enfermedades infecciosas de la boca. México: Edit. Médica Panamericana; 2003.
5. Kuvatanasuchati J, Chamroensaksri N, Tanasupawat S. Phenotypic and genotypic characterization of Thai oral streptococci, lactobacilli and pediococci. Trop Biomed. 2012 Jun;29 (2):254-64
6. Hernandez R, Velasco D, Diaz D, Arevalo K, Garza M, De la Garza M, Cabral C. Zerovalent bismuth nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* growth and formation of biofilm. Int J Nanomedicine. 2012; 7: 2109–13.
7. Guerrero J, Ortiz Z, Peralta L, Perez F. Actividad antibacteriana de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. sobre *Streptococcus mutans*,

- Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* frente a clorhexidina. Rev Cubana Plant Med . 2013;18(2):224-236.
8. Linossier A, Vargas A, Zillmann G, Arriagada M, Rojas R, Villegas R. *Streptococcus mutans*: a semi-quantitative method to assess the risk to oral infections in preschool Chilean children. Rev Med Chil. 2003 Apr; 131(4):412-8.
  9. Fani M, Kohantee J, Dayaghi M. Inhibitory activity of garlic (*Allium sativum*) extract on multidrug-resistant *Streptococcus mutans*. J Indian Soc Pedod Prevent Dent. 2007; 25 (4): 164 – 8.
  10. Molezzi, A y Albedaña, A. Fitomedicina: Usos más comunes en Dermatología Argentina 2002; 7(3): 123-131.
  11. Domingo D, López M. Plantas con acción antimicrobiana. Rev esp quimioter. 2003; 16 (4):385-93.
  12. Alonso, J .Tratado de Fitofármacos y nutraceuticos. 2a. ed. Ed. Corpus. Buenos Aires, 2004
  13. Borja F. Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Cymbopogon citratus* frente al *Streptococcus mutans* in vitro, Facultad de odontología. [Tesis], Lima: Universidad Federico Villareal; 2007.
  14. Negrelle R, Gomes E. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: chemical composition and biological activities. Rev Bras Pl Med. 2007;9(1):80-92.



15. Mongkolsilp S, Pongbupakit I, Sae N, Sitthithaworn W. Radical scavenging activity and total phenolic content of medicinal plants used in primary health care. *SWU J Pharm Sci.* 2004;9(1):32-5.
16. Cápiro N, Sánchez A, Fonseca G, Baluja L, Borges E. Capacidad protectora de *Cymbopogon citratus* DC Stapf ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2001;20 (1):33-8.
17. Rao B, Shanbhoge R, Rao B, Adiga S, Upadhya D, Aithal B, Kumar M. Preventive efficacy of hydroalcoholic extract of *Cymbopogon citratus* against radiation-induced DNA damage on V79 cells and free radical scavenging ability against radicals generated in vitro. *Hum Exp Toxicol.* 2009;28(4):195-202.
18. Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schmeda G. Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J Agric Food Chem.* 2005;53(7):2511-7.
19. Tiwari M, Dwivedi U, Kakkar P. Suppression of oxidative stress and pro-inflammatory mediators by *Cymbopogon citratus* D Stapf extract in lipopolysaccharide stimulated murine alveolar macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(10):2913-9.
20. Agbafor K, Akubugwo E. Hypocholesterolaemic effect of ethanolic extract of fresh leaves of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *Afr J Biotechnol.* 2007;6(5):596-8.

21. Adeneye A, Agbaje E. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of fresh leaf aqueous extract of *Cymbopogon citratus* Stapf. in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007;112(3):440-4.
22. Guzmán S, Balderasa J, Aguilar A, Navarrete A. Sedative activity of some plants used in Mexico to treat insomnia. *Rev Latinoamer Quím.* 2009;37(3):243-51.
23. Sforcin J, Amaral J, Fernandes A, Sousa J, Bastos J. Lemongrass effects on IL-1beta and IL-6 production by macrophages. *Nat Prod Res.* 2009;23(12):1151-9.
24. Figueirinha A, Cruz M, Francisco V, Lopes M, Batista M. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaf infusion in lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells: contribution of the polyphenols. *J Med Food.* 2010;13(3):681-90.
25. Nwachukwu I, Allison L, Chinakwe E, Nwadiaro P. Studies on the effects *Cymbopogon citratus*, *Ceiba pentandra* and *Loranthus bengwelensis* extracts on species of dermatophytes. *J Amer Sci.* 2008;4(4):58-67.
26. Wright S, Maree J, Sibanyoni M. Treatment of oral thrush in HIV/AIDS patients with lemon juice and lemon grass (*Cymbopogon citratus*) and gentian violet. *Phytomed.* 2009;16(2-3):118-24.
27. Okigbo R, Mmekaka C. Antimicrobial effects of three tropical plant extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Afr J Trad CAM.* 2008;5(3):226-9.

28. Asaolu M, Oyeyemi O, Olanlokun J. Chemical compositions, phytochemical constituents and in vitro biological activity of various extracts of *Cymbopogon citratus*. *Pakistan J Nutr.* 2009;8(12):1920-2.
29. Ohno T, Kita M, Yamaoka Y, Imamura S, Yamamoto T, Mitsufuji S, et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.* 2003;8(3):207-15.
30. Blanco M, Costa C, Freire A, Santos J, Costa M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. *Phytomedicine.* 2009;16:265–70. 29.
31. Silva M, Ximenes R, Da Costa J, Leal L, De Lopes A, Viana G. Comparative anticonvulsant activities of the essential oils (EOs) from *Cymbopogon winterianus* Jowitt and *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010;381(5):415-26.
32. Viana G, Vale T, Pinho R, Matos F. Antinociceptive effect of the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. *J Ethnopharmacol.* 2000;70(3):323-7.
33. Restrepo J, Vinasco L, Jaramillo L, Colmenares A. Encapsulamiento de los aceites esenciales de citral (*cymbopogon citratus*) en  $\beta$ -ciclodextrinas usando CO<sub>2</sub> supercrítico. *Ingeniería y Competitividad.* 2009;11(2):9
34. Wilson N, Ivanova M, Watt R, Moffat A. The quantification of citral in lemongrass and lemon oils by near-infrared spectroscopy. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54(9): 1257-67.

35. Abe S, Sato Y, Inoue S, Ishibashi H, Maruyama N, Takizawa T, et al. Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2003;44(4):285-91.
36. Irkin R, Korukluoglu M. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. *Med Food*. 2009;12(1):193-7.
37. Aguilar M. Comparación del efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico con el aceite esencial de Hierba Luisa sobre una cepa de *Candida Albicans* . [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
38. Dawson B, Trapp R. *Bioestadística Médica*. 4ta ed. México: Manual Moderno; 2004.
39. Prieto L, Lamarca R, Casado A. La evaluación de la fiabilidad en las observaciones clínicas: el coeficiente de correlación intraclass. *Med Clin*. 1998; 110(4):142-5.
40. Guerra M, Rodriguez M, Garcia G, Llerena C. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon Citratus* (dc). *Rev Cubana Plant Med* 2004;9(2):44-7

# ANEXOS

## ANEXO 01: CALIBRACIÓN

### Datos recolectados del Investigador y del especialista

#### Espectrofotometría

	investigador 1		2 Especialista		
1	0.480	0.480	0.482	0.000	-0.002
2	0.257	0.257	0.259	0.000	-0.002
3	0.868	0.867	0.868	0.001	0.000
4	0.865	0.866	0.866	-0.001	-0.001
5	0.937	0.938	0.938	-0.001	-0.001
6	0.478	0.478	0.476	0.000	0.002
7	0.350	0.351	0.350	-0.001	0.000
8	0.933	0.933	0.934	0.000	-0.001
9	0.408	0.408	0.409	0.000	-0.001
10	0.400	0.402	0.402	-0.002	-0.002

#### Inspección visual en placas

	Investigador 1		2 Experto		
1	1	1	1	0,000	0
2	1	1	1	0,000	0
3	1	1	1	0,000	0
4	1	1	1	0,000	0
5	0	0	0	0,000	0
6	0	0	0	0,000	0
7	0	0	0	0,000	0
8	0	0	0	0,000	0
9	0	0	0	0,000	0
10	0	0	0	0,000	0

	Correlación intraclase	F	p
Intraevaluador	1,000	144984,444	0,000
Interevaluador	1,000	362467,556	0,000

## ANEXOL 02: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA

% cc	Blanco	REPETICIONES																			
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20
5	0,64	0,483	0,259	0,938	0,866	0,409	0,489	0,359	0,936	0,868	0,403	0,485	0,356	0,934	0,862	0,403	0,480	0,353	0,938	0,865	0,401
2,5	0,23	0,091	0,132	0,157	0,282	0,366	0,092	0,131	0,152	0,280	0,362	0,095	0,122	0,187	0,287	0,361	0,092	0,137	0,151	0,287	0,365
1,25	0,11	0,049	0,068	0,057	0,057	0,060	0,050	0,067	0,058	0,050	0,067	0,049	0,058	0,059	0,057	0,068	0,059	0,068	0,057	0,068	0,067
0,625	0,058	0,151	0,140	0,137	0,150	0,160	0,150	0,149	0,138	0,141	0,147	0,151	0,141	0,137	0,150	0,160	0,151	0,140	0,149	0,131	0,160
0,312	0,037	0,108	0,106	0,164	0,149	0,150	0,107	0,108	0,162	0,148	0,149	0,108	0,107	0,148	0,162	0,148	0,149	0,105	0,163	0,148	0,150
0,078	0,032	0,161	0,137	0,178	0,182	0,165	0,162	0,138	0,177	0,181	0,163	0,160	0,138	0,175	0,181	0,162	0,164	0,139	0,176	0,180	0,162
0,039	0,020	0,168	0,166	0,155	0,177	0,170	0,165	0,175	0,165	0,172	0,160	0,164	0,158	0,159	0,173	0,170	0,176	0,166	0,157	0,175	0,170

**ANEXO 03: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA  
CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA**

Placas Petri	Concentración Mínima Bactericida de <i>Cymbopogon Citratus</i> (Hierba Luisa)						
	No existe crecimiento(-) Existe crecimiento (+)						
	5%	2.5%	1.25%	0.625%	0.312%	0.078%	0.039%
01	-	-	-	+	+	+	+
02	-	-	-	+	+	+	+
03	-	-	-	+	+	+	+
04	-	-	-	+	+	+	+
05	-	-	-	+	+	+	+
06	-	-	-	+	+	+	+
07	-	-	-	+	+	+	+
08	-	-	-	+	+	+	+
09	-	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	+	+	+	+
11	-	-	-	+	+	+	+
12	-	-	-	+	+	+	+
13	-	-	-	+	+	+	+
14	-	-	-	+	+	+	+
15	-	-	-	+	+	+	+
16	-	-	-	+	+	+	+
17	-	-	-	+	+	+	+
18	-	-	-	+	+	+	+
19	-	-	-	+	+	+	+
20	-	-	-	+	+	+	+



## ANEXO 04: PRUEBA DE NORMALIDAD

### Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Directo	136.973	6	133	.000
Modificado	136.973	6	133	.000

### Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

CC			Residuo estandarizado para Directo	Residuo estandarizado para Modificado
1,00	N		20	20
	Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	.00000	.00000
		Desviación estándar	2.433916	2.433916
	Máximas diferencias extremas	Absoluta	.274	.274
		Positivo	.274	.274
		Negativo	-.244	-.244
	Estadístico de prueba		.274	.274
Sig. asintótica (bilateral)		.000 <sup>c</sup>	.000 <sup>c</sup>	
2,00	N		20	20
	Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	.00000	.00000
		Desviación estándar	.995398	.995398
	Máximas diferencias extremas	Absoluta	.232	.232
		Positivo	.232	.232
		Negativo	-.160	-.160
	Estadístico de prueba		.232	.232
Sig. asintótica (bilateral)		.006 <sup>c</sup>	.006 <sup>c</sup>	
3,00	N		20	20
	Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	.00000	.00000
		Desviación estándar	.065252	.065252
	Máximas diferencias extremas	Absoluta	.209	.209
		Positivo	.138	.138
		Negativo	-.209	-.209
	Estadístico de prueba		.209	.209
Sig. asintótica (bilateral)		.022 <sup>c</sup>	.022 <sup>c</sup>	
4,00	N		20	20
	Media		.00000	.00000

	Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Desviación estándar	.078761	.078761
	Máximas diferencias extremas	Absoluta	.162	.162
		Positivo	.153	.153
		Negativo	-.162	-.162
	Estadístico de prueba		.162	.162
	Sig. asintótica (bilateral)		,178 <sup>c</sup>	,178 <sup>c</sup>
5,00	N		20	20
	Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	.00000	.00000
		Desviación estándar	.221265	.221265
	Máximas diferencias extremas	Absoluta	.333	.333
		Positivo	.244	.244
		Negativo	-.333	-.333
	Estadístico de prueba		.333	.333
	Sig. asintótica (bilateral)		,000 <sup>c</sup>	,000 <sup>c</sup>
6,00	N		20	20
	Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	.00000	.00000
		Desviación estándar	.147381	.147381
	Máximas diferencias extremas	Absoluta	.197	.197
		Positivo	.148	.148
		Negativo	-.197	-.197
	Estadístico de prueba		.197	.197
	Sig. asintótica (bilateral)		,041 <sup>c</sup>	,041 <sup>c</sup>
7,00	N		20	20
	Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	.00000	.00000
		Desviación estándar	.064006	.064006
	Máximas diferencias extremas	Absoluta	.120	.120
		Positivo	.103	.103
		Negativo	-.120	-.120
	Estadístico de prueba		.120	.120
	Sig. asintótica (bilateral)		,200 <sup>c,d</sup>	,200 <sup>c,d</sup>

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

d. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

## ANEXO 05: PRUEBA DE KRUSKALL-WALLIS

### Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>

	Directo	Modificado
Chi-cuadrado	100,896	68,788
Gl	6	6
Sig. Asintótica	,000	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: CC

### PRUEBA DE DUNCAN

#### Directo

Duncan<sup>a</sup>

CC	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	
3,00	20	,05965			
5,00	20		,13695		
4,00	20		,14665		
6,00	20		,16405		
7,00	20		,16705		
2,00	20		,20645		
1,00	20			,60435	
Sig.		1,000	,062	1,000	

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20,000.

#### Modificado

Duncan<sup>a</sup>

CC	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
3,00	20	-,05035	
1,00	20	-,03565	
2,00	20	-,02355	
4,00	20		,08865
5,00	20		,09995
6,00	20		,13205
7,00	20		,14705
Sig.		,451	,111

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 20,000.