

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

“Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) LHér. frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ ”

Área de Investigación:

Farmacognosia

Autor (es):

Bach. Camino Oliva, Xiomara Thais

Jurado Evaluador:

Presidente: Asmat Abano, Angel Steven

Secretario: Claudet Sanchez, Fiorella Grace

Vocal: Zarate Arce, Marco Antonio

Asesor:

Mejía Delgado, Elva Manuela

Código Orcid: <https://orcid.org/0000-0003-0296-2695>

Trujillo – Perú

2021

Fecha de sustentación: 2021/12/23

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios por brindarme tantas bendiciones y oportunidades. A mis padres por estar siempre a mi lado apoyándome, guiándome y sacrificando tanto para que yo pueda lograr mis objetivos. A mis abuelos que siempre han creído en mí y se han sentido orgullosos de cada logro que he tenido.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Elva M. Mejía Delgado quien fue la asesora y microbióloga de esta investigación, por su tiempo, dedicación, apoyo y guía brindada durante el proceso y desarrollo de la ejecución (siembra y determinación del efecto antibacteriano del extracto) y la estructuración del estudio.

Al botánico y director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, el Mg. Segundo Leiva González, quien ayudo con la selección, identificación y determinación taxonómica del ejemplar.

A la Dra. Marilu Soto Vásquez, química farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, por haber apoyado en la preparación del extracto.

Así mismo, al Dr. Jorge Neciosup Obando, por el apoyo en aspectos técnicos y estrategia de análisis estadístico.

A mis familiares y amigos por su gran apoyo moral y económico, sobre todo a mis padres.

Finalmente, en estas líneas quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible esta investigación, a la Dra. Esther Villavicencio Rosas y a los que, de alguna manera, me apoyan a crecer como persona.

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM.

Material y Método: Las concentraciones del extracto de etanólico de *Pelargonium peltatum* usadas en el estudio fueron 5%, 25%, 50%, 75% y 100%. La muestra estuvo constituida por 10 repeticiones por cada concentración del extracto *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. Se realizó un control negativo el cual fue alcohol al 70° y un grupo control positivo formado por antibióticos como la ampicilina, vancomicina y gentamicina más vancomicina. El medio empleado para la siembra de las placas fue *Triptéina Soya Agar* (ATS). Para evaluar el efecto antibacteriano se empleó el método de macrodilución en caldo de *tioglicolato* para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y el método Kirby Bauer para determinar la susceptibilidad bacteriana. La lectura de las placas se realizó a las 24 horas a través de la inspección visual. Para la recolección de los datos de la CMI se realizó el conteo de la Unidades Formadora de Colonias (UFC) y para los datos de la susceptibilidad bacteria, se midió con una regla milimétrica los halos de inhibición.

Resultados: Los promedios de UFC fueron de 1.40 para la de concentración de 5% para la de 25% de 1.00 , la de 50% de 0.40, la de 75% de 0.30 y la de 100% de 0.00. La susceptibilidad fue límite, siendo los promedios de los halos de inhibición del crecimiento del *E. faecalis*. 9.20 mm para la concentración de 5%, 10.70mm para la de 25%, 11.85mm para la de 50%, 12.40mm para la de 75% y 13.90mm para la de 100%.

Conclusión: El extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM

Palabras claves: Efecto antibacteriano, concentración mínima inhibitoria, susceptibilidad bacteriana.

ABSTRACT

Objective: To determine the *in vitro* antibacterial effect of ethanolic extract of *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™.

Material and Method: The concentrations of the ethanolic extract of *Pelargonium peltatum* used in the study were 5%, 25%, 50%, 75% and 100%. The sample constituted by 10 repetitions for each concentration of the *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér extract. A negative control was carried out which was alcohol at 70° and a positive control consisting of antibiotics such as ampicillin, vancomycin and gentamicin plus vancomycin. The medium used for the seeding of the plates was *Tryptein Soy Agar* (ATS). To evaluate the antibacterial effect, the macrodilution method in *Thioglycollate* broth was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the Kirby Bauer method to determine bacterial susceptibility. The plates were read at 24 hours by visual inspection. Colony Forming Units (CFU) were counted to collect MIC data, and for bacterial susceptibility data, inhibition halos were measured with a millimeter rule.

Results: The CFU averages were 1.40 for the concentration of 5% for the 25% of 1.00, the 50% of 0.40, the 75% of 0.30 and the 100% of 0.00. The susceptibility was borderline, being the averages of the halos of inhibition of the growth of *E. faecalis*. 9.20 mm for the 5% concentration, 10.70mm for the 25% concentration, 11.85mm for the 50% concentration, 12.40mm for the 75% concentration and 13.90mm for the 100% concentration.

Conclusion: The ethanolic extract of *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. has an *in vitro* antibacterial effect against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™

Key words: Antibacterial effect, minimum inhibitory concentration, bacterial susceptibility.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	
1.1.	Realidad problemática.....	8
1.2.	Marco Teórico.....	9
1.3.	Antecedentes del estudio.....	12
1.4.	Justificación del estudio	13
1.5.	Formulación del problema	13
1.6.	Hipótesis	13
1.7.	Objetivos de la investigación.....	13
	1.7.1. Objetivo general	13
	1.7.2. Objetivos específicos.....	14
1.8.	Operacionalización de las variables	15
II.	METODOLOGÍA	
2.1.	Tipo de investigación	16
2.2.	Población y muestra	16
	2.2.1. Área de estudios	16
	2.2.2. Definición del problema muestral	16
	2.2.3. Características de la población muestral.....	16
	2.2.4. Diseño estadístico de muestreo.....	17
	2.2.5. Tipo de muestreo (método de selección)	20
2.3.	Técnicas e instrumentos de investigación.....	20
	2.3.1. Método de recolección de datos	20
	2.3.2. Instrumento de recolección de datos	20
	2.3.3. Procedimiento de recolección de datos	21
2.4.	Procedimientos y análisis de datos	29
2.5.	Consideraciones bioéticas.....	30
III.	RESULTADOS	31
IV.	DISCUSIÓN	36
V.	CONCLUSIONES	42
VI.	RECOMENDACIONES	43

VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	44
VIII.	ANEXOS.....	48

I. INTRODUCCION

1.1 Realidad problemática

Se ha demostrado que los microorganismos presentes en el sistema de conductos radiculares son la principal causa de fracaso de la terapia endodóntica, tanto por sus productos metabólicos como por el efecto del biofilm que puede colonizar las estructuras del diente.¹

Mientras los conductos radiculares infectados de dientes, no endodonciados, generalmente presentan una flora polimicrobiana con predominio de las anaerobias, los cultivos obtenidos de dientes infectados sometidos previamente a la obturación de conductos radiculares presentan muy pocas especies o inclusive una sola, el *Enterococcus faecalis*.²

Las plantas medicinales son un recurso de la naturaleza que nos sirven para curar o prevenir determinadas enfermedades, afecciones o problemas de salud.³ Por ello, el uso de las sustancias naturales en el tratamiento de diferentes enfermedades que incluyen las de etiología infecciosa sigue siendo, hasta la actualidad, un desafío en la investigación de la terapéutica médica.⁴ Lo que demanda una investigación continua, para encontrar principios activos naturales, que tengan actividad farmacológica ante las afecciones microbiológicas producidas por la resistencia adquirida de los microorganismos y cuyo tratamiento sea respetuoso con el ser humano.⁵

El objetivo de este estudio experimental y longitudinal es evaluar la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas del *Pelargonium peltatum* frente a *E. faecalis*, ya que es el principal causal de los fracasos del tratamiento de conductos. Además se pretende dejar un nuevo conocimiento, que en el futuro servirá como base para otras investigaciones.

1.2 Marco teórico

Entre las principales causas de la falla de los tratamientos de conductos es el fallo en la remoción de los tejidos pulpares y de los microorganismos que se encuentra en los canales radiculares, en especial el *Enterococcus faecalis*.⁶

Enterococcus faecalis, bacteria en forma de coco, Gram positiva, anaerobia facultativa, inmóvil y no esporulada. Su tamaño oscila entre 0,5 a 0,8 micrómetros⁷. Su hábitat es tracto gastrointestinal, pero también se puede encontrar en lengua, mucosa oral, bolsas periodontales y conductos radiculares⁸, además, es muy frecuente cuadros infecciosos bucales, como en periodontitis apical, conductos expuestos a la cavidad bucal y necrosis pulpar⁹.

Las pruebas bioquímicas diferenciales entre especies del genero *Enterococcus* son: acidificación de Arabinosa, tolerancia al Telurito, determinación de la movilidad y la presencia de pigmento amarillo de las cuales el *E. faecalis* solo es positivo para el Telurito.¹⁰

Es capaz de sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias⁷, y esto se le atribuye a su amplia variedad de polimorfos genéticos, la producción de gelatinasa, seriana, proteasas, proteínas de unión al colágeno que permiten unirse a la dentina, entre otras¹¹, además, tiene la capacidad de formar biofilm, lo cual, permite que la bacteria penetre los túbulos dentinarios, permaneciendo ahí, a pesar de la instrumentación química-mecánica, contaminando así los conductos luego de su obturación.^{12,13}

Además, la resistencia del *Enterococcus faecalis* a los anitioticos como la gentamicina (por medio de la producción de betalactamasas), a los glucopéptidos (como vancomicina y teicoplanina) y a la ampicilina, ha amentado drasticamente, en los últimos años, debiense a factores como

antibioticoterapia o hospitalización previa, uso prolongado de Vancomicina, ceftazidima, cefalosporinas, aminoglicósidos, ciprofloxacina, aztreonam, penicilinas, un largo periodo de hospitalización, enfermedades de fondo, cancer o contagio por proximidad con otro caso o con personal u objetos portadores de la cepa.^{38,39}

El tratamiento estandar frente a *E.faecalis* sensibles, generalmente es ampicilina o vancomicina, pero en aquellos casos de cepas resistentes, el tratamiento combinado con un aminoglucósido, ampicilina + gentamicina, permite conseguir un efecto sinérgico y una mayor actividad bactericida , en caso de reacción adversa o alergias a penicilinas, o infecciones por cepas de *E. faecalis* resistentes a penicilina se utilizara la combinacio de vancoicina + getamicina^{40,41,42}

El Geranio, del género *Pelargonium*, al cual pertenecen un grupo diverso de plantas con una amplia variedad de hábitos y hábitats de crecimiento, nativas del sur de África en su mayoría, y que además, son miembros de la familia *Geraniaceae*.¹⁴ Son plantas ornamentales que se pueden encontrar en todo el mundo adornando jardines, fachadas y balcones. Su popularidad se debe a su abundante floración con una gran diversidad de colores, sus diferentes patrones de hojas y su facilidad de cultivo, pudiendo adaptarse y sobrevivir en diferentes condiciones ambientales.¹⁵

El *Pelargonium Peltatum* (L.) o Geranio hoja de hidra: planta decumbente o apoyante, con tallos débiles, muy alargados, glabros o ligeramente pubescentes. Hojas peltadas con limbo de 4 a 8 cm de diámetro, provistas de 5 lóbulos poco profundos, enteros o dentados, terminados en un pequeño mucrón, largamente pecioladas; flores rosadas, rojas o blancas, simples o dobles, de 2 a 3cm de diámetro, dispuestos en umbelas.¹⁶

La hoja del *P. Peltatum* (L.) contiene altos niveles de oxalato de potasio y ácido málico, así como de otros ácidos orgánicos, ácidos cítrico, oxálico, succínico y tartárico, cuyos niveles varían según la cantidad de luz solar. Las

pruebas fitoquímicas indicaron la presencia de proantocianidas, saponinas y compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides, terpenos además de cumarinas y azúcares reductores. Los taninos hidrolizables como la *Pelargonidina* parecen ser componentes principales de las partes elevadas de *Pelargonium spp.*¹⁷

Se confirma en estudios la actividad antimicrobiana del *Pelargonium*, atribuida a la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, saponinas, taninos, esteroides, antocianinas y quinonas, principalmente de los tres primeros, cuyos principios activos son de gran importancia en la inhibición del crecimiento bacteriano.¹⁸

El efecto antimicrobiano de los flavonoides se debe a su anillo B, el cual interactúa con los hidrógenos de los ácidos nucleicos, inhibiendo su síntesis¹⁹. En cuanto al efecto antibacteriano de los taninos, la parte penta-O-galloil- β -D-glucosa del tanino es la que tiene la acción sobre las membranas de las bacterias, haciéndolas permeables y formando complejos con iones metálicos. Además, nos dice que son capaces de inhibir la formación de la biopelícula y que las bacterias Gram-positivas presentan mayor susceptibilidad frente a estas ²⁰. De otro lado, la mayor actividad antimicrobiana de las saponinas se debe a tres de sus compuestos: el ácido 3-O- β -D-glucuronopiranosil-oleanólico, ácido 3-O- β -D-glucuronopiranosiloleanólico 28-O- β -D -glucopiranosil éster y 3- O - β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2) - ácido β -D-glucuronopiranosil oleanólico ²¹ y esto se debe a que se une a los lípidos de la membrana celular (colesterol y otros esteroides) ocasionando un desajuste de las funciones de ésta, deteniendo el crecimiento celular.²²

1.3 Antecedentes del estudio

Álvarez M. (Perú, 2014) determinó que el extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* “Propóleo” presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, teniendo como concentración mínima bactericida y susceptibilidad al 25%.²³

García K. (Perú, 2016) demostró que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, siendo su concentración mínima bactericida del aceite 25%.²⁴

Maquera J. (Perú, 2016) determinó la acción antibacteriana *in vitro* del extracto de las hojas de *Pelargonium hortorum* (Geranio) frente a *Streptococcus mutans* y a *E. faecalis*, la susceptibilidad se presentó desde la concentración de 17.5mg/ml y la concentración mínima inhibitoria fue la de 25 mg/ml..²⁵

Ortiz F. (Perú, 2018) evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* de la *Musa acuminata* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, determinando que la concentración mínima inhibitoria es 50% y la susceptibilidad al 100%.²⁶

Ríos N. y Dávila R. (Perú, 2013) evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, determinando, que presenta actividad antibacteriana sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*, con un 69,22% de inhibición; y, una concentración mínima inhibitoria de 10,67 mg/ml del extracto.²⁷

Guerrero et al. (Perú, 2013) compararon la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. con la clorhexidina frente a *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*,

demostrando que el extracto acuoso de *Pelargonium peltatum* tiene actividad antibacteriana sobre las tres especies de *Streptococcus*.¹⁸

1.4 Justificación del estudio

Existiendo evidencia científica que el *Enterococcus faecalis* es el patógeno de mayor frecuencia en los fracasos endodónticos y su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para otras bacterias, y existiendo antecedentes de los efectos antibacterianos que posee el geranio; tiene importancia y utilidad la presente investigación en demostrar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. (Geranio hiedra) frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM, debido a que no existen estudios reportados de esta planta contra dicha bacteria.

Además, es una planta que crece en nuestro medio, fácil de cultivar, es sumamente adaptativa, es abundante, resiste a condiciones medioambientales extremas y es accesible de conseguir.

1.5 Formulación del problema

¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér? frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM?

1.6 Hipótesis

El extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. presenta efecto antibacteriano frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM y este varía según su concentración.

1.7 Objetivos de la investigación

1.7.1 Objetivo General:

- Conocer el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM.

1.7.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. sobre el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™.
- Determinar cuál porcentaje del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. es el que produce mayor efecto inhibitorio sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™, concentración mínima bactericida.

1.8 Operacionalización de las variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional e Indicadores	Tipo de variable		Escala de medición
			Naturaleza	Función	
Extracto etanólico del <i>Pelargonium peltatum</i> (L.) L'Hér.	Sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima (hoja del <i>Pelargonium peltatum</i>), usando etanol como solvente. ²⁸	Diferentes porcentajes del extracto etanólico <ul style="list-style-type: none"> • 5% • 25% • 50% • 75% • 100% 	Cuantitativa	Independiente	Razón
Efecto antibacteriano sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 TM	Capacidad de una sustancia química sintetizada parcial o totalmente en laboratorio que es capaz de inhibir el crecimiento y acabar con <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 TM ²⁴	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Conteo de UFC -Negativo: 0 a 30 UFC -Bajo: >30 a 100 UFC -Medio: >100 a 300 UFC -ALTO: >300 UFC	Cuantitativa	Dependiente	Razón
		Susceptibilidad bacteriana: Halo de inhibición mediante la escala de Durafford , diámetro en mm.	Cuantitativa	Dependiente	Razón

II. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación

Según el periodo 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	Según la forma de recolección de datos
Prospectivo	Transversal	Comparativo	Experimental	Prolectivo

2.2. Población y muestra

2.2.1. Área de estudio

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

2.2.2. Definición de la población muestral

Conjunto de placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*), que contuvieron la macrodilución en caldo de tioglicolato del microorganismo de prueba: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM y la concentración del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. correspondiente.

2.2.3. Características de la población muestral

2.2.3.1 Criterios de inclusión:

- Cultivos en placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*), que contuvieron la macrodilución en caldo de tioglicolato del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM y las distintas

concentraciones del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

2.2.3.2 Criterios de eliminación:

- Cultivos en placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*) que contuvieron la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ más las respectivas concentraciones del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. que presente algún tipo de daño o rajadura en su estructura durante el proceso de incubación.
- Cultivos en placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*) que contuvieron la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ más las respectivas concentraciones del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. cuyo resultado en el proceso de conservación, manipulación o incubación pueda ser dudoso o no permita su medición posterior.

2.2.3.3 Criterios de exclusión:

- Cultivos de placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*) que contuvieron la macrodilución de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ más las respectivas concentraciones del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. que sufran contaminación o deterioro durante la siembra.

2.2.4. Diseño estadístico de muestreo

2.2.4.1 Unidad de muestreo

- **Para la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Cada una de las placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*) que contuvieron la macrodilución en caldo tioglicolato de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y la concentración correspondiente del extracto etanólico de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

- **Para la susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.**

Cada una de las placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*) que contuvieron la macrodilución en caldo tioglicolato de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y los discos de inhibición embebidos en extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. a la concentración correspondiente.

2.2.4.2 Unidad de análisis

- **Para la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Cada uno de los cultivos en placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*) que contuvieron la macrodilución en caldo tioglicolato de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y la concentración correspondiente del extracto etanólico de *Pelargonium peltatum* (L.)L'Hér.

- **Para la susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.**

Cada uno de los cultivos en placas Petri con agar ATS (*Agar Tripteína Soya*) que contuvieron la macrodilución en caldo tioglicolato de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ y los discos de inhibición embebidos en el extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. a una concentración correspondiente.

2.2.4.3 Tamaño de muestra

Para determinar el tamaño muestral se usó la fórmula que corresponde a comparación de medias:²⁹

$$n_0 = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 (S_1^2 + S_2^2)}{(M_1 - M_2)^2}$$

Donde:

n = número de placas Petri con ATS (*Agar Tripteína Soya*) y discos de inhibición por concentración

$Z_\alpha = 1.96$ Valor Z al 5% de error tipo I

$Z_\beta = 1.645$ Valor Z al 20% de error tipo II

$S_1=0.5$ Desviación estándar de la inhibición de la susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* al 5% del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. (Geranio hiedra).

$S_2=0.89$ Desviación estándar de la inhibición de la susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* al 25% del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

$M_1=10$ Mediana de las 5 muestras al 5% del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

$M_2=11.5$ Mediana de las 5 muestras al 25% del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

Resultando: $n_0 = 9,15$

Redondeando:

$n=10$ (unidad muestral) por cada grupo experimental.

La muestra total estuvo constituida por 50 repeticiones, distribuidas en 10 repeticiones para

cada grupo experimental. (Anexo 01)
(Anexo 02)

2.2.5. Tipo de muestreo (método de selección)

La presente investigación se realizó a través del método no probabilístico.

2.3 Técnicas e instrumentos de investigación

2.3.1 Método de recolección de datos

Observación

2.3.2 Instrumento de recolección de datos

Para el análisis de lo observado, se elaboraron dos fichas como instrumento de recolección: la ficha de registro de datos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la ficha de registro de datos para la susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. (Anexo 03) (Anexo 04)

Además, se empleó una regla milimetrada como instrumento de medición de los halos de inhibición para la determinación de la susceptibilidad de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

La lectura de los resultados microbiológicos (conteo de unidades formadoras de colonias y los halos de inhibición) fueron realizados por un especialista, Dra. Elva Mejía, microbióloga, docente principal, a tiempo completo del departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo y coordinadora de la sección de Microbiología, para tener una mayor confiabilidad y certeza de resultados

2.3.3 Procedimiento de recolección de datos.

2.3.3.1. Descripción del proyecto

A. De la asesoría de la tesis

Constancia de aceptación de asesoría de tesis (Anexo 14)

B. De la aprobación del proyecto

El primer paso fue obtener el permiso para su ejecución, mediante la aprobación del Comité Permanente de Investigación Científica de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego con la correspondiente Resolución Decanal. (Anexo 06) (Anexo 07)

C. De la autorización para la ejecución

Se solicitó el permiso para poder trabajar en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNT. La investigadora estuvo bajo la supervisión del microbiólogo. (Anexo 11)

D. De la selección de la muestra de estudio

Se determinó la concentración mínima inhibitoria y susceptibilidad del microorganismo frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér., para lo cual se realizaron 5 muestras por cada porcentaje de extracto etanólico. El grupo control positivo estuvo compuesto de 5 muestras por cada antibiótico usado, ampicilina, vancomicina y vancomicina con gentamicina, estos son los de mayor uso contra el *Enterococcus faecalis*, el control negativo estuvo constituido por 1 muestra de etanol al 70°. El proyecto permitió determinar la muestra y el reajuste de la metodología, procedimientos e

instrumento de recolección de datos. (Anexo 01)
(Anexo 02)

E. De la obtención de la cepa

Se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ del laboratorio GenLab del Perú SAC en Lima, obtenido del cepario del Banco Bacteriológico del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNT.

De la preparación del inóculo y activación de la cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™

Posterior a su recepción por el laboratorio, la ampolla que contiene el cultivo liofilizado, se inició su activación, verificando que el lugar se encuentre totalmente inocuo y preparado con todo el material necesario para dicha activación. Para abrir el liofilo, primero se cargó una pipeta Pasteur estéril con agua esterilizada, con la otra mano se tomó la ampolla y se acercó a la llama, se calentó unos segundos y se aseguró que la llama solo afecte entre el algodón y la parte estrecha de la ampolla. El siguiente paso consistió en apartar la ampolla de la llama e inmediatamente dejar caer unas gotas de agua sobre la zona calentada de forma que el vidrio se resquebraje. A continuación, se dejó la pipeta con agua en el pipetero, se cogió la pinza metálica se remojo en etanol, se flameó, se cerró y se dio con ella un golpe seco sobre la zona resquebrajada. Luego se retiraron los pedazos de vidrio y se sacó el tapón de algodón hacia el extremo abierto. La ampolla se colocó en una superficie limpia (gradilla) y se tomó otra pipeta Pasteur estéril y que se cargó

con el medio líquido recomendado (caldo de tioglicolato). El volumen necesario para rehidratar las células liofilizadas siempre será menor a 0,5 ml para no rebasar la ampolla, teniendo en cuenta la altura y diámetro (en todo momento se manipuló la ampolla como si fuera un tubo de cultivo). Se retiró el tapón de algodón y se flameó la apertura. Lo siguiente fue volver a suspender cuidadosamente el cultivo liofilizado introduciendo el medio líquido, aspirando y expulsando varias veces con la pipeta la suspensión de células y evitando la formación de burbujas. La suspensión que se adquirió se usó para inocular un medio sólido (agar soya y agar sangre) y transferir el resto a un medio líquido (hay que agotar todo el volumen, no se puede guardar parte de la suspensión). Por último, los medios se llevaron a condiciones de microanaerobiosis en una jarra de Gaspak, la cual se colocó durante 3 días en una estufa a 37°C.

Posteriormente, se eligió el medio sólido que mostró el mejor crecimiento, del cual se recolectaron colonias para la confección de las placas máster. Paralelamente, se prepararon cultivos de almacenamiento para conservar la cepa.³⁰

La concentración que se utilizó para sembrar las placas máster se comparó con el tubo N° 0.5 de la escala Mac Farland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ bact/ml³¹.

F. Del cultivo de la cepa

El cultivo de la cepa se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UNT,

por la investigadora principal, bajo la supervisión del experto microbiólogo. (Anexo 12)

G. De la recolección del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

Recolectado por la investigadora y procesado con la ayuda del profesional, químico farmacéutico, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. (Anexo 10)

Se recolectó aproximadamente 1kg de hojas de Geranio hiedra de la Universidad Privada Antenor Orrego, del distrito de Trujillo, provincia de Trujillo, departamento de La Libertad.

Identificación y determinación taxonómica de la especie

Se llevó un ejemplar completo y seco de la planta al Herbario Antenor Orrego (HAO) de la UPAO para su identificación y determinación taxonómica. (Anexo 08) (Anexo 09).

Preparación de la muestra vegetal

- **Selección:** Se seleccionaron hojas en buenas condiciones, que no estén marchitas, descoloridas y sin problemas de hongos.
- **Lavado y desinfección:** Se lavó la muestra vegetal seleccionada con agua potable. Seguido se realizó la desinfección de estas utilizando hipoclorito de sodio al 0.5%. Por último, se enjuagó con agua potable para retirar los residuos de hipoclorito.
- **Secado:** Las hojas se colocaron sobre papel Kraft para el secado de su superficie. Una vez

terminado el secado, se procedió a la fase de deshidratación, para lo cual se utilizó una estufa de circulación de aire por convección forzada (40°C) por 48 horas para su deshidratación.

- **Pulverización:** Las hojas, una vez deshidratadas, fueron pulverizadas con ayuda de un molino.
- **Tamizaje:** Las hojas pulverizadas fueron tamizadas a través del tamiz N° 0.75. Al producto se le denominó polvo de hojas.
- **Almacenamiento:** El polvo de hojas fue pesado para luego ser almacenado en un frasco de vidrio de color ámbar de boca ancha.

Preparación del extracto etanólico de las hojas de geranio

Se obtuvieron 160g de polvo de hojas de geranio, y se los colocó en un recipiente de vidrio de boca ancha color ámbar. Luego, se le añadió al recipiente 1 litro de etanol al 70° G.L. (Gay Lussac). Se mezcló, teniendo en cuenta que la mezcla debe ocupar como máximo las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente. Se selló el recipiente para su macerado por 7 días, agitándose 15 minutos, dos veces al día.

Terminado el tiempo de macerado, se procedió a filtrarlo en una bomba de vacío, la cual usa un papel de filtro Whatman N° 2. Al líquido resultante se le denominó extracto etanólico.

Para conseguir el concentrado del extracto etanólico, se utilizó un rotavapor, y luego se realizó el secado completo de este en una estufa de circulación de aire

a 40°C por 24 horas. El producto resultante fue un extracto blando, a partir del cual se prepararon las concentraciones de 5% (50mg/mL), 25% (250mg/mL), 50% (500mg/mL), 75% (750mg/mL) y 100% (1000mg/mL) disueltas en etanol 70° G.L.

Finalmente, los extractos fueron filtrados con filtros Millex (Millipore) de 0,22mm, se colocaron en frascos de vidrio estéril de color ámbar y se refrigeraron a 4°C hasta su posterior uso.³²

H. Del efecto antibacteriano:

Se determinó a través de:

- Concentración Mínima Inhibitoria
- Susceptibilidad bacteriana.

De la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante la técnica de macrodilución en caldo de tioglicolato, con el fin de enfrentar la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ con cinco diferentes concentraciones del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. (5%, 25%, 50%, 75% y 100%). Teniendo el inóculo bacteriano y los extractos etanolitos listos, se inició el proceso de determinación de la CMI, procediendo a colocar 0.2ml del inóculo de la macrodilución en caldo en cada uno de los 5 tubos de ensayo de 15 x 100mm, para luego añadir 0.4ml de extracto etanólico en sus diferentes concentraciones.

Seguidamente, se procedió a colocar los tubos con la muestra en una jarra Gaspak para generar el

ambiente de microanaerobiosis y se colocó la jarra en la estufa a 37°C por 24 horas para su incubación. Terminado el tiempo de incubación, se realizó la siembra, para ello se tomó en una jeringa estéril 0.1ml de muestra de cada uno de los tubos, colocándola en las placas Petri preparadas con agar soya, para luego ser extendida por todas las superficies del agar con la ayuda de la espátula Drigalsky, previamente esterilizada. Este procedimiento permitió que la bacteria crezca en toda la extensión de la placa. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10cm de la llama de un mechero. Las placas sembradas se llevaron a una jarra de Gaspak para el proceso de microanaerobiosis.

Luego, esta se incubó en una estufa a 37°C por 24 horas.

Tras el periodo de incubación se examinaron cada una de placas.³³

La Concentración Mínima Inhibitoria es la concentración más baja de un agente antimicrobiano requerida para inhibir el crecimiento de un microorganismo. Se determinó mediante el método del conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC)³³.

La placa con la concentración en la cual se encontró un crecimiento menor a treinta colonias, se consideró como Concentración Mínima Inhibitoria²⁴.

Negativo (-): 0 a 30 UFC

Bajo (+): >30 a 100 UFC

Medio (++) : >100 a 300 UFC

Alto (+++): >300 UFC

Susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. (Geranio hiedra):

Se determinó a través de:

- Método Kirby Bauer (método de difusión en disco)

Teniendo las cinco concentraciones del extracto etanolito *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér., 5%, 25%, 50%, 75% y 100% (Foto 33), las placas sembradas (Foto 34) y los discos de papel filtro estériles, se procedieron a sumergir por una hora los discos en el extracto en cada una de sus concentraciones, para luego escurrirlos por unos segundos y con ayuda de una aguja estéril se colocaron en las placas Petri sembradas con el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM. Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10cm de la llama de un mechero.

Posteriormente, las placas se incubaron en un ambiente de microanaerobiosis. Para esto, se usó una cámara para anaerobios (la jarra de gaspack), la cual se introdujo en una estufa a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Finalmente, la lectura se llevó a cabo a las 24 horas mediante la inspección visual de cada placa. Con una regla milimetrada se midió el diámetro de los halos de inhibición de cada una de las placas.

El diámetro de esta zona de inhibición fue directamente proporcional a la actividad antibacteriana del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. sobre el microorganismo en estudio.³³⁻³⁴ Para interpretar los resultados se tomaron como referencia las pautas de Duraffourd y Lapraz¹¹ que consideran la actividad antibacteriana del gel como:

Nula (-): para un diámetro ≤ 8 mm.

Sensibilidad límite (sensible = +): para un diámetro de 9 a 14mm.

Sensibilidad media (muy sensible = ++): para un diámetro de 15 a 19mm.

Sumamente sensible (S.S. = +++): para un diámetro igual o superior a 20mm.

2.4 Plan de procesamiento estadístico para análisis de datos

Los datos recolectados fueron procesados y analizados de manera automatizada haciendo uso de la hoja de cálculo en Microsoft Excel y del programa estadístico SPSS Statistics 22.0 (IBM, Armonk, NY, USA), para luego presentar los resultados en tablas y/o gráficos de acuerdo a los objetivos planteados. Se presentan media, desviación estándar, mediana y rango intercuartil. Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para las dos variables en estudio a fin de verificar si están normalmente distribuidas (Anexo 05). Se encontró que la variable de susceptibilidad sí sigue una distribución normal, en tanto que la CMI no lo es. Por ello, se emplearon pruebas no paramétricas para el análisis estadístico. Para determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. frente al *Enterococcus faecalis*, se

emplearon la prueba Kruskal-Wallis (prueba múltiple de medianas) y la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró un nivel de significancia del 5%.

2.5 Principios bioéticos.

Se tomó en cuenta el manejo y manipulación de desechos de las muestras, especialmente la cepa de *Enterococcus faecalis*, siguiendo las pautas señaladas por el manual de Bioseguridad en Laboratorios de Microbiología y Medicina.³⁵

La ejecución del estudio se basó, además de la Ley General de Salud del Perú (Ley N° 026842) Art. 86.³⁶

III. RESULTADOS

El presente estudio tuvo como objetivo conocer el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM. Encontrándose los siguientes resultados:

El extracto etanólico de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. presentó efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM. (Tabla 1)

En la tabla 2 observa que la concentración del 5% tuvo un promedio de 1.40 UFC, la de 25% de 1.00 UFC, la de 50% de 0.40 UFC, la de 75% de 0.30 UFC y la de 100% de 0.00 UFC, lo que indica que hay una relación inversa entre las concentraciones del extracto y el efecto antibacteriano, a mayor concentración, menor número de UFC. También indica que las concentraciones de 5%, 25% y 100% tienen una diferencia estadística entre ellas, pero que las concentraciones de 50% y 75% presentan diferencias estadísticas del antes mencionadas, pero no entre ellas.

En las tablas 1 y 2 se identifican la concentración mínima inhibitoria resultando ser la de 5%.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la susceptibilidad *in vitro* del *Enterococcus faecalis* frente al extracto etanólico de *Pelargonium peltatum*, observándose que este patógeno presenta una susceptibilidad límite a todas las concentraciones del extracto.. También se observa los promedios de los halos de inhibición del crecimiento del *E. faecalis*. Para la concentración de 5% fue 9.20 mm, 10.70mm para la de 25%, 11.85mm para la de 50%, 12.40mm para la de 75% y 13.90mm para la de 100%, lo cual demuestra que las cinco concentraciones del extracto son directamente proporcionales al efecto antibacteriano, es decir, a mayor concentración, mayor tamaño del halo. Además, las concentraciones de 5%, 25% y 100% son diferentes estadísticamente, pero las de 50% y 75% son diferentes del resto, pero iguales entre sí.

Tabla 1

Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM.

Variable	C%	N	Media	Me	RI	p*
CMI (UFC)	a. 5%	10	1.40 ^{c,d,e}	1.00	1.25	0.002
	b. 25%	10	1.00 ^e	1.00	1.50	
	c. 50%	10	0.40 ^a	0.00	0.50	
	d. 75%	10	0.30 ^a	0.00	1.00	
	e. 100%	10	0.00 ^{a,b}	0.00	0.00	
	Ampicilina	10	0.0	0.0	0.0	
SUCEPTIBILIDAD (mm)	a. 5%	10	9.20 ^{b,c,d,e}	9.00	1.50	< 0.001
	b. 25%	10	10.70 ^{a,c,d,e}	10.50	0.75	
	c. 50%	10	11.85 ^{a,b,e}	11.75	0.50	
	d. 75%	10	12.40 ^{a,b,e}	12.50	0.75	
	e. 100%	10	13.90 ^{a,b,c,d}	14.00	1.25	
	Ampicilina	10	41.6	41.0	9.25	
Vancomic	10	29.3	28.5	1.50		

Vanc+Gent	10	38.1	38	1.63
-----------	----	------	----	------

*Prueba Kruskal-Wallis; DE, desviación estándar; Me, mediana; RI, rango intercuartil. Los superíndices indican diferencia significativa entre los grupos (Prueba U Mann-Whitney).

Tabla 2

Concentración mínima inhibitoria *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. al 5%, 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM.

Concentración	N	Media	DE	Me	RI	Min	Max
a. 5%	10	1.40	1.17	1.00	1.25	0.00	4.00
b. 25%	10	1.00	1.15	1.00	1.50	0.00	3.00
c. 50%	10	0.40	0.84	0.00	0.50	0.00	2.00
d. 75 %	10	0.30	0.48	0.00	1.00	0.00	1.00
e. 100%	10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Ampicilina	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Vancomic	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Vanc + Gent	10	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

DE, desviación estándar; Me, Mediana; RI, rango intercuartílico; Min, mínimo; Max, máximo

Tabla 3

Susceptibilidad *in vitro* del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

Concentración	N	Media	DE	Me	RI	Min	Max
a. 5%	10	9.20	0.79	9.00	1.50	8.50	10.50
b. 25%	10	10.70	0.54	10.50	0.75	10.00	11.50
c. 50%	10	11.85	0.67	11.75	0.50	11.00	13.50
d. 75%	10	12.40	0.74	12.50	0.75	11.50	14.00
e. 100%	10	13.90	1.17	14.00	1.25	12.50	16.50
Ampicilina	10	41.6	5.1	41.0	9.25	35.0	48.0
Vancomic	10	29.3	1.72	28.5	1.50	28.0	32.0
Vanc + Gent	10	38.1	1.26	38.0	1.63	36.0	39.5

DE, desviación estándar; Me, Mediana; RI, rango intercuartílico; Min, mínimo; Max, máximo

IV. DISCUSIÓN

El presente estudio experimental *in vitro* demostró que el extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. tiene efecto antibacteriano frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM. (Tabla 1)

Al carecer esta investigación de estudios previos sobre el extracto etanólico de *P. peltatum* (L.) L'Hér. frente al *E. faecalis*, se tuvo que realizar obligatoriamente un estudio piloto previo a la ejecución que permitió validar nuestras técnicas e instrumentos utilizados y cuyos resultados fueron favorables para la ejecución del presente estudio. (Anexo 01) (Anexo 02)

La actividad antimicrobiana del *Pelargonium peltatum* se atribuye principalmente a la presencia de sus fitoconstituyentes, tales como flavonoides, taninos y saponinas¹⁸, cuyos principios activos son de gran importancia en la inhibición del crecimiento bacteriano, razón por la cual este estudio fue orientado a verificar estas propiedades, enfrentándolas a la principal bacteria que genera el fracaso de los tratamientos endodónticos, el *Enterococcus faecalis*.²

El presente estudio, demostró que el extracto etanólico *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. (Geranio hiedra) posee efecto antibacteriano *in vitro* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM, en las cinco concentraciones del extracto empleadas (5%, 25%, 50%, 75%, 100%) y son directamente proporcionales al efecto antibacteriano, es decir, a mayor concentración del extracto, mayor efecto antibacteriano. (Tabla 1) Además, el control positivo (Ampicilina, Vancomicina, Vancomicina más Gentamicina), antibióticos de elección utilizados en infecciones contra *E. faecalis*, presentó mayor efecto antibacteriano que las concentraciones usadas en los grupos experimentales. Con lo cual demuestra que dichos

antibióticos son sumamente efectivos contra dicha bacteria concordando con la literatura reportada.^{40,41,42}. Aunque también el uso continuo de estos antibióticos ha demostrado crear resistencias y disminuir su efectividad^{38,39}; por lo que da mayor importancia al estudio realizado, que nos permite contar con otra alternativa de tratamiento natural y efectivo contra el *Enterococcus faecalis*.

El efecto antibacteriano se determinó a través de dos métodos: el Kirby Bauer, el cual se emplea para determinar la susceptibilidad bacteriana, dando como resultados promedios de halos de inhibición del crecimiento entre 10.70mm (concentración al 5%) y 13.90mm (concentración al 100%), lo cual indica que el patógeno empleado presenta una susceptibilidad límite frente al extracto etanólico de *P. peltatum*. según las pautas de Duraffourd y Lapraz¹¹. El segundo método es la macrodilución en caldo, técnica donde el agar y el extracto tienen contacto directo, este se emplea para determinar concentración mínima inhibitoria (CMI), además, refuerza la prueba de difusión en discos, ya que esta presenta algunas desventajas como que el papel filtro Whatman está compuesto de celulosa, la cual presenta grupos OH (hidroxilos) libres, los cuales generan que los discos tengan una superficie hidrofílica, ocasionando la absorción de compuestos catiónicos en la superficie del disco, afectando la difusión completa.³⁷ Los resultados de esta técnica nos demostraron que todas las concentraciones empleadas (5%, 25%, 50%, 75%, 100%) inhiben el crecimiento bacteriano, por tanto, la concentración mínima inhibitoria se presentó desde la concentración más baja que fue la de 5%, ya que se encontraron menos de 30 unidades formadoras de colonias en los cultivos donde se usó.

Álvarez M nos dice en su estudio que el extracto etanólico de *Propolis de apis mellífera* "Propoleo" presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM debido a su principal compuesto fenólico, el flavonoide, coincidiendo con el presente estudio y

con la literatura, que indica que este componente presenta efecto antimicrobiano.²³

El estudio del Álvarez M presentó promedios entre 4.88 y 0.75 UFC para la CMI y 8.5 a 12.63 mm para la susceptibilidad, además, la concentración de 25% resultó ser tanto la CMI y susceptibilidad, mientras que en el presente estudio el promedio de las UFC estuvo entre 1.40 - 0.00 y el de los halos de inhibición entre 9.20 -14.00mm. La CMI y susceptibilidad se presentan en la concertación de 5%, lo cual nos indica que el extracto etanólico de *P. peltatum* aparentemente presenta mayor efecto antibacteriano que el etanólico de *Propolis de apis mellífera* "Propoleo". Esto pudo deberse a la presencia de más componentes antibacterianos en las hojas del geranio hiedra que sirven como coadyuvantes.²³

En el estudio de Ortiz F también se describe la actividad antimicrobiana de los flavonoides, donde nos indican que la *Musa acuminata* (plátano) presenta este compuesto fenólico, compuesto en común con el *P. peltatum*, al cual se le atribuye diversas formas de inhibición del crecimiento bacteriano. Esta investigación demostró que la *M. acuminata* presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente al *E. faecalis*, obteniendo una CMI al 50% y una susceptibilidad al 100%, mientras que en la presente investigación la CMI y la susceptibilidad se presentaron desde la concentración de 5%, demostrando tener mayor efecto antibacteriano.¹¹

Otros estudios, como en el de García K en *Cinnamomum zeylanicum*, nos indican que la presencia de compuesto fenólicos produce el efecto antibacteriano en este, compuestos que comparte con el geranio hidra, los cuales actúan a nivel de la membrana bacteriana, ocasionando la pérdida de integridad de esta.²⁴

García K demostró en su estudio que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* presentó efecto antibacteriano *in vitro* sobre el

E. faecalis en todas sus concentraciones (25%,50%,75%100%), siendo su concentración mínima bactericida del aceite 25%. De igual manera, en el presente trabajo se tuvo actividad antibacteriana en todas sus concentraciones (5%, 25%, 50%, 75% y 100%), pero con CMB de 100%. Aparentemente el aceite esencial de *Cinnamomum* tuvo un mayor efecto bactericida que el extracto etanólico de *P. peltatum*, esto podría deberse a que el efecto de los aceites esenciales es mayor que el de los extractos; aunque cabe indicar que la presente investigación no tuvo como objetivo determinar la CMB.²⁴

Córdova I.et al. evaluaron el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto hexánico proveniente de la raíz de *Salvia apiana*, lo que atribuyen a sus fitocostituyentes, los terpenoides, que causan la inhibición del crecimiento bacteriano debido al daño que genera a la integridad de la membrana celular, efecto semejante al que genera los compuestos secundarios del *P. peltatum*.²⁵

La investigación de Maquera J. revela que el extracto de las hojas de *Pelargonium hortorum* (Geranio) presenta acción antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* y al *E. faecalis*, en virtud a sus fitoconstituyentes (flavonoides, taninos).

La susceptibilidad contra el *E. faecalis* solo fue límite, la concentración mínima inhibitoria fue la de 25mg/ml, en el presente trabajo la susceptibilidad fue también límite, pero la concentración mínima inhibitoria fue la de 50mg/ml. Ambos extractos demostraron tener efecto antibacterial frente al *E. faecalis*. lo cual se puede deber a los metabolitos secundarios que tienen en común.²⁵

Ortiz D et al concuerdan con la presente investigación, ya que indica que la presencia de taninos inhibe el crecimiento de las bacterias Gram positivas y que este efecto está correlacionado a la formación de complejos con la pared celular, lo cual provoca cambios morfológicos e induce deficiencias nutricionales, lo que nos permitió atribuir parte de la acción antimicrobiana del extracto etanólico de *P. peltatum* a estos.²⁶

Ríos N y Dávila R evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso liofilizado de *Geranium ayavacense* en *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*²⁵, concluyendo que éste presenta actividad antimicrobiana frente a todas estas cepas, debido a la presencia de los metabolitos secundarios como taninos, esteroides, flavonoides, entre otros, compuestos comunes en la familia *Geraniaceae* a la que también pertenece el *P. peltatum*, geranio estudiado en el presente trabajo. En ambos estudios se probó la concentración de 500mg/ml, donde el promedio del diámetro de los halos de inhibición producido por el extracto acuoso fue de 13.33mm, mientras que en el extracto etanólico fue de 11.85mm, resultados parecidos que comprobaron que *Enterococcus faecalis* presenta una sensibilidad límite a ambos geranios según la Escala de Duraffourd y Lapraz.²⁷

Santos A et al evaluaron el efecto *in vitro* de extractos ricos en saponinas, fitoconstituyentes principales en los árboles de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria*, así como también en el *P. peltatum*. Ambos estudios coinciden que las saponinas generan un desajuste de las funciones de la membrana bacteriana y como consecuencia, la detención del crecimiento celular. Por tal motivo, en ambos estudios se comprobó la actividad antibacteriana de este metabolito.²²

En la investigación de Guerrero J et al, en la cual usan el mismo ejemplar que en el presente estudio, *P. peltatum*. se compara la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto acuoso de *P. peltatum* con la clorhexidina frente a patógenos de la cavidad bucal (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*), teniendo como resultado que el extracto acuoso de *Pelargonium peltatum* tiene actividad antibacteriana sobre las tres especies de *Streptococcus*, y en altas concentraciones supera a la clorhexidina. Por tal motivo, en la presente investigación se enfrentó este ejemplar a otro tipo de patógeno bucal (*Enterococcus faecalis*), obteniendo resultados similares.¹⁸

Para determinar el tamaño muestral se uso la la fórmula de comparación de medias, para comprobar si los valores de una característica que es cuantitativa difieren al agruparlas en dos o más grupos. Se usa para comparar dos valores de una variable continua según los valores de una variable, que se pueden reunir en dos o más categorías y se usa como prueba para datos independientes.

La presente investigación, no logró igualar o superar el control positivo, pero demostró el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *P. peltatum* frente al *Enterococcus faecalis*, conocimiento que abre un nuevo campo en la investigación farmacológica y microbiológica, permitiendo ser un coadyuvante en los tratamientos o retratamientos de conductos y, así mismo, ser una alternativa natural, económica, con respaldo científico y que podría evitar que los microorganismos generen resistencia a productos con tan alto efecto antibacteriano.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér tuvo efecto antibacteriano *in vitro* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™.
2. La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér sobre el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ fue la 5%.
3. El *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ presentó una susceptibilidad límite frente a todas las concentraciones (5%, 25%, 50%, 75%, y 100%) del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar otros estudios *in vitro* utilizando productos naturales frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM para determinar si estos tienen efecto antibacteriano.
2. Continuar con las investigaciones del efecto antibacteriano de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér sobre el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM en animales, y posteriormente en ensayos clínicos.
3. Realizar investigaciones sobre el efecto antibacteriano del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér frente a otros microorganismos orales.

VII. BIBLIOGRAFÍA:

1. Floreano M, Machado T, Barrocas D, Rodríguez J, Vidal F. Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. Rev. Bras.Odontol. [Internet] 2016 [citado 12 de enero]; 73(3):212-217. Disponible en: <https://revista.aborj.org.br/index.php/rbo/article/view/732>
2. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto G. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de radicales de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. Revista Odontológica Mexicana [Internet] 2015 [citado 12 de enero]; 19 (3):181-186 Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-199X2015000300181&script=sci_abstract
3. Miguel V, Rojas N. Plantas medicinales utilizadas para afecciones en Estomatología en los consultorios dentales del distrito de Huancayo. [Tesis Título Profesional]. Huancayo: Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt; 2016.
4. Azuero A, Jaramillo-Jaramillo C, San Martin D, D´ Armas H. Análisis del efecto antibacteriano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. UNEMI 2016 [citado 12 de enero]; 9(20):11-18.
5. Cassana R. Eficacia antibacteriana in vitro del gel natural de *Aloe barbadensis*, clorhexidina 2% e hidróxido de calcio sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 [Tesis Título Profesional]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2016.
6. Rodríguez C, Oporto G. Implicancias clínicas de la contaminación microbiana por *Enterococcus faecalis* en canales radiculares de dientes desvitalizados: Revisión de la literatura. Revista Odontológica Mexicana [Internet] 2015 [citado 01 de enero];19 (3): 181-186 Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=58799>
7. Pardi G, Guilarte C, Cardozo E, Briceño E. Detección de *Enterococcus faecalis* en dientes con fracasos en el tratamiento endodóntico. Acta Odontológica Venezolana. [Internet] 2009 [citado 01 de enero]; 47(1): 1-11. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2009/1/art-12/>

8. Ardila C, Maggiolo S, Dreyer E, Armijo J, Silva N. *Enterococcus faecalis* en dientes con periodontitis apical asintomática. Arch méd Camagüey. [Internet] 2021 [citado 12 de enero], 18(4), 415-423. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552014000400007
9. Tabassum S, Khan F. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. Eur J Dent. [Internet] 2016 [citado 12 de enero]; 10(1):144-7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27011754/>
10. Porte L, Herve E, Prat S, Chanqueo L. *Enterococcus* sp. Rev Chil Infect. [Internet] 2007 [citado 12 de enero]; 24 (3):231. Disponible en: <https://www.scielo.cl/pdf/rci/v24n3/art10.pdf>
11. Ortíz F. Efecto antibacteriano de la *Musa acuminata* (Plátano) frente al *Enterococcus faecales* ATCC 29212 in vitro. [Tesis Título Profesional]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2018.
12. Plotino G, Cortese T, Grande N, Leonardi D, Di Giorgio G, Testarelli L, et al. New technologies to improve root canal disinfection. Braz Dent J. [Internet] 2016 [citado 12 de enero]; 27(1):3-8. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27007337/>
13. Echeverri D, Aldrete D. In vitro antibacterial effect of 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in dentin previously irrigated with 5% sodium hypochlorite. Int. J. Odontostomat. [Internet] 2015 [citado 12 de enero]; 9(1):25-29. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-381X2015000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
14. The Herb Society of America. Pelargoniums An Herb Society of America Guide. The Herb Society of America [Internet] 2006 [citado 12 de enero]; 8-49. Disponible en: <https://www.yumpu.com/en/document/read/11422339/pelargoniums-the-herb-society-of-america>
15. Alonso M. Biotecnología aplicada a mejora de *Pelargonium*. [Tesis Doctoral]. Madrid Universidad Complutense de Madrid; 2002.
16. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. 3era edición. Buenos Aires ACME S.A.C.I. 1988.
17. Scott G, Springfield E. *Pelargonium peltatum* Herba. [Internet]. Sudáfrica: Instituto Nacional de Biodiversidad de Sudáfrica; 2004 [revisado: 28 de octubre 2020; consultado: 26 enero 2021]. Disponible en: <http://pza.sanbi.org/informationlibrary/medicinalmonographs/1102/2004?page=4>
18. Guerrero J, Ortiz Z, Peralta L, Pérez F. Actividad antibacteriana de *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis* frente a clorhexidina.

- Rev. Cubana de Plant Medi. [Internet] 2013 [citado 12 de enero]; 18(2):224-2356. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200006
19. Tim T, Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoid. Int J Antimicrob Ag [Internet] 2005 [citado 12 de enero]; 26(5): 343-356. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16323269/>
 20. Maisetta G, Batoni G, Caboni P. Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus*. BMC Complement Altern , [Internet] 2019 [citado 12 de enero]; 19(82):2-11. Disponible en: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-019-2487-7>
 21. Tagousop C, Tamokou J, Kengne I, Ngnokam D, Voutquenne-Nazabadioko L. Antimicrobial activities of saponins from *Melanthera elliptica* and their synergistic effects with antibiotics against pathogenic phenotypes. BMC Chem. [Internet] 2018 [citado 12 de enero];12 (97):1-9 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6768134/>
 22. Santos A, Jiménez H, Cano A. Efecto in vitro de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales. Cienc. Tecnol. Agropecuaria. [Internet] 2005 [citado 12 de enero]; 6(1):20-25. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945018003.pdf>
 23. Álvarez M. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de propolis de *Apis mellífera* (Propoleo) frente a *Enterococcus faecales* ATCC 29212. [Tesis Título Profesional]. Trujillo: Universidad Privada Antenor Orrego; 2014.
 24. García K. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) frente a *Enterococcus faecales* ATCC 29212 in vitro. Rev. Simiykita 2016; 2(1):9-15.
 25. Maquera J. Actividad antibacteriana del extracto del *Pelargonium hortorum* (Geranio) frente a *Streptococcus mutans* Tacna 2016. [Tesis Título Profesional]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2019.
 26. Ortiz D, Posada S, Noguera R. Efecto de metabolitos secundarios de las plantas sobre la emisión entérica de metano en rumiantes. Livestock Research for Rural Development. [Internet] 2005 [citado 12 de enero]; 26(11):2-24. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd26/11/orti26211.html>
 27. Ríos N, Dávila R. Actividad antibacteriana in vitro de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y

Staphylococcus aureus, IMET – EsSalud - 2013. [Tesis Título Profesional]. Iquitos: Universidad Nacional de La Amazonia Peruana; 2013. Disponible en:

28. Extracto [Internet]. España: Wikipedia, La enciclopedia libre; 2020 [actualizado 25 de noviembre del 2020; consultado 30 de marzo del 2021]. Disponible en:

<https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Extracto&oldid=131201478>

29. Dawson B, Trapp G. Bioestadística Médica. 4ta ed. México: Manual Moderno; 2005.

30. Logistik Soluciones Integrales. Recuperación de cultivos liofilizados [video en internet]. Youtube. 16 de mayo del 2016. [citado 02 del marzo del 2021]. Recuperado a partir de: <https://www.bibguru.com/es/g/cita-vancouver-video-de-youtube/>

31. Estándar de McFarland [Internet]. España: Wikipedia, La enciclopedia libre; 2020 [actualizado 01 de abril del 2020; consultado 02 abril 2021]. Disponible en:

https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Est%C3%A1ndar_de_McFarland&oldid=124774056

32. Miranda M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba. 2002.

33. Cavalieri J, Rankin D, Ortez H, McCarter Y, Sharp S, Sautter R, et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 1era.ed. Washington: American Society for Microbiology; [Internet] 2005 [citado 12 de enero. Disponible en:

<https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

34. Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. 1era.ed. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Lima; [Internet] 2002 [citado 12 de enero]. Disponible en: https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua_l_sensibilidad.pdf

35. Organización Mundial de la Salud (OMS). Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3° ed. Ginebra: Biblioteca Organización Mundial de la Salud. 2005.
36. ESSALUD. Ley General de Salud, Ley N°26842. 1997.
37. Ramirez L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, [Internet] 2009 [citado 12 de enero];15(42): 263-268. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
38. Cercenado E. Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. [Internet] 2011 [citado 12 de enero]; 29:59–65. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/ccs-2010-bacteriologia.pdf>
39. Ahumada SE, Otero RM, Noriega ER. Resistencia de los enterococos a los antimicrobianos: implicaciones clínicas. *Medigraphic.com*. [Internet] 1999 [citado el 12 de diciembre]. 19(3):116-32. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-1999/ei995c.pdf>
40. Herrera L. ENDOKINETIC-CEF: tratamiento de la endocarditis infecciosa por *Enterococcus faecalis* en programas de tratamiento antibiótico endovenoso domiciliario. [Tesis Doctoral Inédita]. Sevilla. Universidad de Sevilla; 2021.
41. Girón J., Pérez R. Tratamiento de las infecciones por enterococo. *Rev Clin Esp*. [Internet] 2003 [citado 12 de enero]; (10):482–5. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000400010http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000400010
42. Sparo M, Delpech G, García Allende N. Impact on Public Health of the spread of High-Level resistance to gentamicin and vancomycin in enterococci. *Front Microbiol*. [Internet] 2018 [citado 12 de enero];9(3073). Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03073/full>

ANEXO 01

ESTUDIO PILOTO: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. contra el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ a través del conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Trujillo, 2019.

No. PLACA	AMPICILINA	VANCOMICINA	VANC+GENT	5%	25%	50%	75%	100%
1	N	N	N	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N	N	N

VALORES:

- Negativo (-) : 0 a 30 UFC
- Bajo(+) : >30 a 100 UFC
- Medio(++) : >100 a 300 UFC
- Alto(+++) : >300 UFC

- Se categorizaron los resultados debido a que sólo se presentó el desarrollo a las 24 horas a 37°C de una colonia de *Enterococcus faecalis* en dos placas Petri con ATS (Agar Tripteína Soya) al 25 % de extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér.

ANEXO 02

ESTUDIO PILOTO: Susceptibilidad del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) L'Hér. (mm) Trujillo, 2019.

Diámetro del halo de inhibición (DHI), medianas y desviación estándar, por esquemas de tratamientos del <i>Pelargonium peltatum</i> y fármacos.								
Prueba piloto de 5 repeticiones por esquema. Trujillo, 2020								
No. PLACA	AMPICILINA	VANCOMICINA	VANC+GENT	5%	25%	50%	75%	100%
1	41	29	39.5	9.5	11	10.5	12.5	15
2	35	28.5	38	10.5	12.5	12.5	12	15
3	38	28	36	10	12.5	12.5	12.5	16
4	48	32.5	38	9.5	11.5	11.5	14.5	13
5	46	28.5	39	10.5	10.5	11.5	12	15
Mediana	41.00	28.50	38.00	10.00	11.50	11.50	12.50	15.00
D.E.	5.40	1.82	1.34	0.50	0.89	0.84	1.04	1.10

Prueba de Normalidad del diámetro del halo Test de Shapiro W. Estad=0.836 P=0.000
(Rechazamos la normalidad de la distrib. De DHI)

Prueba alternativa ANOVA, comparación múltiples de medianas KRUSKAL WALLIS p=0.032
Esto evidencia que existe, efectivamente diferencia significativa entre las medianas de DH entre los esquemas de tratamientos que se comparan.

VALORES:

- Nula (-) : para un diámetro $\leq 8\text{mm}$.
- Sensibilidad límite (sensible = +): para un diámetro de 9 a 14mm.
- Sensibilidad media (muy sensible = ++): para un diámetro de 15 a 19mm.
- Sumamente sensible (S.S. = +++): para un diámetro igual o superior a 20mm.

ANEXO 03

FICHA DE REGISTRO DE DATOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A TRAVÉS DEL CONTEO DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)

PLACA PETRI	CMI del extracto etanólico del <i>Pelargonium peltatum</i> (L.) L'Hér.					A	V	V+G
	5%	25%	50%	75%	100%			
01	2	0	0	1	0	0	0	0
02	0	1	2	0	0	0	0	0
03	2	3	2	0	0	0	0	0
04	4	0	0	0	0	0	0	0
05	2	1	0	0	0	0	0	0
06	0	1	0	0	0	0	0	0
07	1	3	0	1	0	0	0	0
08	1	0	0	0	0	0	0	0
09	1	1	0	0	0	0	0	0

10	1	0	0	1	0	0	0	0
----	---	---	---	---	---	---	---	---

Nota: Se hizo un control de crecimiento de colonias del *Enterococcus faecalis* en agar soya tripteína, en un ambiente de microanaerobiosis, usando la jarra Gaspak, en cuatro placas petri: dos placas con Agar Soya Tripteína puro y dos placas más con Agar Soya Tripteína más alcohol al 70%.

PLACA PETRI	Susceptibilidad del <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212™ frente al extracto etanólico del <i>Pelargonium peltatum</i> (L.) L'Hér. (mm)			
----------------	--	--	--	--

Se realizó una lectura a las 24 horas, determinandose un crecimiento mayor de 300 unidades formadoras de colonias en todas las placas Petri con Agar Soya Tripteína.

ANEXO 04

FICHA DE REGISTRO DE DATOS PARA SUSCEPTIBILIDAD DEL *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ATCC 29212™ FRENTE AL EXTRACTO ETANÓLICO DEL *PELARGONIUM PELTATUM* (L.) L'HÉR. (MM)

	5%	25%	50%	75%	100%	A	V	V+G
01	9.5	10.5	11	11.5	13	41	29	39.5
02	8.5	10.5	12	12.5	13	35	28.5	38
03	10	11.5	12	12.5	12.5	38	28	36
04	8.5	11.5	13.5	14	16.5	48	32.5	38
05	10.5	11	11.5	12	14	46	28.5	39
06	8.5	10.5	11.5	12.5	14	46	28.5	39
07	8.5	11	12	12	14	35	32.5	36
08	9.5	10.5	12	12.5	13	48	29	39.5
09	10	10	11.5	13	15	38	28	38
10	8.5	10	11.5	11.5	14	41	28.5	38

- Nula (-) : para un diámetro ≤ 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +): para un diámetro de 9 a 14mm.
- Sensibilidad media (muy sensible = ++): para un diámetro de 15 a 19mm.
- Sumamente sensible (S.S. = +++): para un diámetro igual o superior a 20mm.

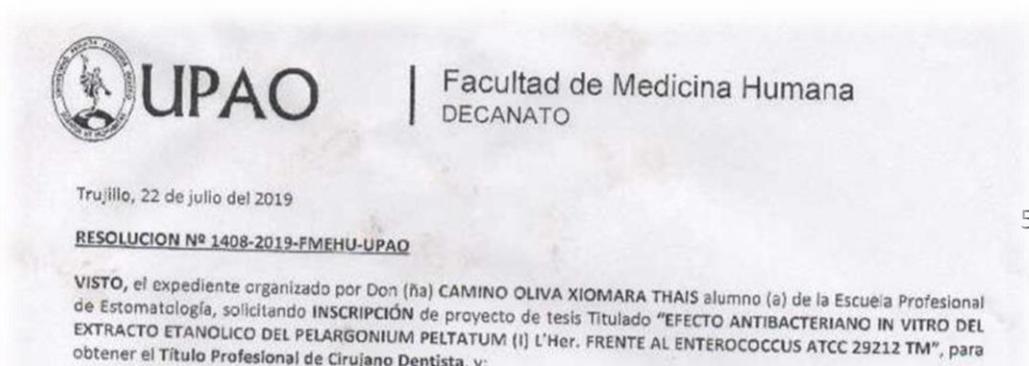
ANEXO 05

PRUEBAS DE NORMALIDAD						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
SUSCEPTIBILIDAD	,095	50	,200*	,972	50	,280

CMB	,359	50	,000	,688	50	,000
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors.						

ANEXO 06

RESOLUCIÓN DECANAL DE INSCRIPCIÓN DE PROYECTO DE TESIS



ANEXO 07

RESOLUCIÓN DEL COMITÉ DE BIOÉTICA



UPAO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

Comité de Bioética

RESOLUCIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA N°0280-2021-UPAO

Trujillo, 19 de noviembre de 2021

VISTO, el correo electrónico de fecha 18 de noviembre de 2021 presentado por la alumna CAMINO OLIVA XIOMARA THAIS, quien solicita autorización para realización de investigación, y;

CONSIDERANDO:

Que por correo electrónico, la alumna CAMINO OLIVA XIOMARA THAIS solicita se le de conformidad a su proyecto de investigación, de conformidad con el Reglamento del Comité de Bioética en Investigación de la UPAO.

Que en virtud de la Resolución Rectoral N° 3335-2016-R-UPAO de fecha 7 de julio de 2016, se aprueba el Reglamento del Comité de Bioética que se encuentra en la página web de la universidad, que tiene por objetivo su aplicación obligatoria en las investigaciones que comprometan a seres humanos y otros seres vivos dentro de estudios que son patrocinados por la UPAO y sean conducidos por algún docente o investigador de las Facultades, Escuela de Posgrado, Centros de Investigación y Establecimiento de Salud administrados por la UPAO.

Que en el presente caso, después de la evaluación del expediente presentado por la alumna, el Comité Considera que el mencionado proyecto no contraviene las disposiciones del mencionado Reglamento de Bioética, por tal motivo es procedente su aprobación.

Estando a las razones expuestas y de conformidad con el Reglamento de Bioética de Investigación;

SE RESUELVE:

PRIMERO: APROBAR el proyecto de investigación: EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PELARGONIUM PELTATUM (I) L'Her. FRENTE AL ENTEROCOCCUS ATCC 29212™.

SEGUNDO: DAR cuenta al Vicerrectorado de Investigación.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y ARCHÍVESE.

Dr. José Guillermo González Cabeza
Presidente del Comité de Bioética
UPAO

ANEXO 08

CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE



UPAO | Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 15-2019-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

CONSTANCIA

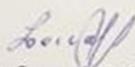
Que **Xiomara Camino Oliva**, bachiller en Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

Pelargonium peltatum (L.) L'Hér. (Geraniaceae)

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: «Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 2912™».

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 10 de mayo de 2019



Mg. Segundo Leiva González
Director
Museo de Historia Natural y Cultural

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

Av. América Sur 3145 Monseñor Trujillo - Perú

ANEXO 09

IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE



ANEXO 10

CONSTANCIA DE ASESORÍA EN LA PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo **Marilú Roxana Soto Vásquez**, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con número de colegiatura N° 06952.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado en la preparación del extracto etanólico de las hojas de *Pelargonium peltatum*, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, a la alumna **Xiomara Thais Camino Oliva**, de la Facultad de Medicina Humana, de Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego.

Así mismo, la preparación del extracto, será utilizada para la ejecución de la tesis titulada: **"Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico del *Pelargonium peltatum* (L.) Hér. frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212"**.

Se expide esta constancia a solicitud del interesado, para los fines que estime pertinentes.

Trujillo 12 agosto del 2019




Dra. MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Laboratorio de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo

ANEXO 11

PERMISO PARA USO DE LABORATORIO

PERMISO PARA USO DE LABORATORIO

Yo, **Elva Manuela Mejía Delgado**, docente principal de la Facultad de Medicina Humana con el código 3147. Coordinadora de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de Trujillo .

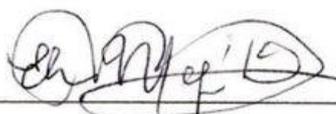
Doy permiso a la Srta. **XIOMARA THAIS CAMINO OLIVA** Bachiller de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo para que pueda realizar la fase experimental de su tesis titulada: **“Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Pelargonium peltatum* (L.) Her. Frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM”**.

Brindando el apoyo necesario en cuanto equipo, material de vidrio y otros, así mismo, la asesoría necesaria en la manipulación de los microorganismo, reactiva y equipos del laboratorio de Microbiología de la Sección mencionada.

Se expide la presente para los fines correspondientes.

Trujillo, 27 de agosto del 2019

Atentamente



MEJÍA DELGADO, ELVA MANUELA

.....
Dra. Elva Mejía Delgado
FACULTAD DE MEDICINA
Coordinadora de Sección
C. 548

ANEXO 12

CONSTANCIA DE ASESORÍA EN EL DESARROLLO MICROBIOLÓGICO

CONSTANCIA DE ASESORÍA

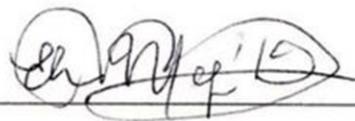
Yo, **Elva Manuela Mejía Delgado**, docente principal, a tiempo completo, con código UNT: 3147 del Departamento Ciencias Básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo y coordinadora de la Sección de Microbiología.

CERTIFICO:

Haber asesorado el Proyecto de Tesis titulada: "**Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Pelargonium peltatum* (L.) Her. Frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM**", cuyo autor es: **XIOMARA THAIS CAMINO OLIVA** Bachiller de la Escuela de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo. Cuyo estudio experimental fue realizado en fechas 3 de septiembre del 2019 al 14 de septiembre del mismo año.

Se expide la presente para los fines correspondientes.

Trujillo, 14 de septiembre del 2019



MEJÍA DELGADO, ELVA MANUELA

Dra. Elva Mejía Delgado
FACULTAD DE MEDICINA
Coordinadora de Sección
C. 548

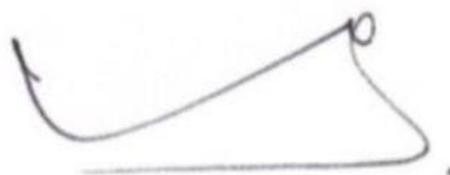
CONSTANCIA DE ASESORÍA EN BIOESTADÍSTICA

CONSTANCIA

Quien suscribe, Dr. **Jorge Neciosup Obando**, de profesión licenciado en estadística, con DNI 17911612, domicilio en Urb. Los Laureles Mz. D 15 de la ciudad de Trujillo, doy constancia de que con fechas 23 de agosto de 2020 y 5 de abril del 2021 fui consultado por la Srta. **XIOMARA THAIS CAMINO OLIVA** sobre algunos aspectos técnicos y estrategia de análisis estadístico que hizo en su trabajo de investigación de título "**Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Pelargonium peltatum* (L.) Her. Frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM**". Que me fue remitido vía web. Al respecto le alcancé mi opinión sobre como la mediana es un indicador más robusto que el promedio aritmético y la utilidad de ello en su estudio.

Comunico esto a solicitud de la parte interesada

Trujillo, 6 de junio, 2021



Jorge E. Neciosup Obando
LICENCIADO EN ESTADÍSTICA
COESPE 1024

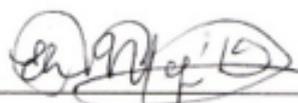
ANEXO 14

CONSTANCIA DE ASESORÍA DE TESIS

CONSTANCIA DE ASESORIA

El que suscribe Dra. ELVA MANUELA MEJÍA DELGADO, deja constancia de que la Srta. Xiomara Thais Camino Oliva, bachiller de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego, se encuentra apta para sustentar la tesis que lleva como título "Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Pelargonium Peltatum* (L.) L' Hér. frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™"

Atentamente



MEJÍA DELGADO, ELVA MANUELA

Dra. Elva Mejía Delgado
FACULTAD DE MEDICINA
Coordinadora de Sección
C. 548

Asesora: Dra. Elva Manuela Mejía Delgado

Código UNT: 3147

ID: 000025016

MICROBIOLÓGICO

ANEXO 13

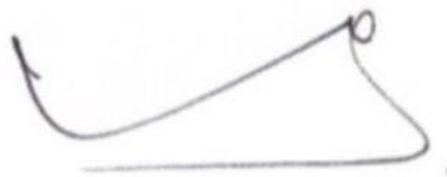
CONSTANCIA DE ASESORÍA EN BIOESTADÍSTICA

CONSTANCIA

Quien suscribe, Dr. **Jorge Neciosup Obando**, de profesión licenciado en estadística, con DNI 17911612, domicilio en Urb. Los Laureles Mz. D 15 de la ciudad de Trujillo, doy constancia de que con fechas 23 de agosto de 2020 y 5 de abril del 2021 fui consultado por la Srta. **XIOMARA THAIS CAMINO OLIVA** sobre algunos aspectos técnicos y estrategia de análisis estadístico que hizo en su trabajo de investigación de título "**Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Pelargonium peltatum* (L.) Her. Frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212TM**". Que me fue remitido vía web. Al respecto le alcancé mi opinión sobre como la mediana es un indicador más robusto que el promedio aritmético y la utilidad de ello en su estudio.

Comunico esto a solicitud de la parte interesada

Trujillo, 6 de junio, 2021



Jorge E. Neciosup Obando
LICENCIADO EN ESTADÍSTICA
COESPE 1024

ANEXO 14

CONSTANCIA DE ASESORÍA DE TESIS

CONSTANCIA DE ASESORIA

El que suscribe Dra. ELVA MANUELA MEJÍA DELGADO, deja constancia de que la Srta. Xiomara Thais Camino Oliva, bachiller de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego, se encuentra apta para sustentar la tesis que lleva como título "Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Pelargonium Peltatum* (L.) L' Hér. frente al *Enterococcus faecalis* ATCC 29212™".

Atentamente



MEJÍA DELGADO, ELVA MANUELA

.....
Dra. Elva Mejía Delgado
FACULTAD DE MEDICINA
Coordinadora de Sección
C. 548

Asesora: Dra. Elva Manuela Mejía Delgado

Código UNT: 3147

ID: 000025016

ANEXO 15

FOTOS DE LA METODOLOGÍA

Preparación del extracto etanólico de *P. Peltatum*



Foto 01

Recolección de las hojas de Geranio en el jardín de la Universidad Privada Antenor Orrego



Foto 02

Selección de la hoja, deben estar en buen estado, no hongos, no manchas o decoloración



Foto 03
Lavado y desinfección de las hojas



Foto 04
Las hojas se llevan a secar a una estufa de circulación de aire por convección forzada (40°C) por 48 horas.

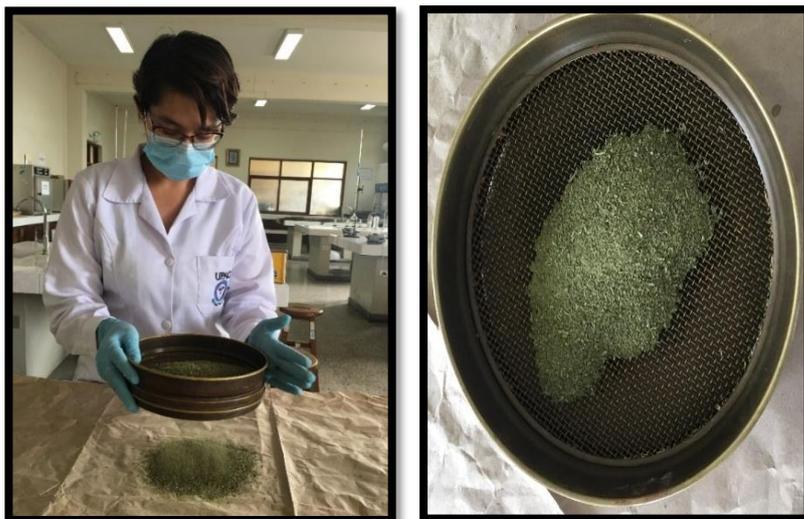


Foto 05
Las hojas se

Foto 06

Las hojas pulverizadas se tamizan a través del tamiz N° 0.75



Foto 07

El polvo de las hojas se almacena en un frasco de vidrio de color ámbar de boca ancha



Foto 08

El polvo de las hojas se pesa (160 g)



Foto 9

Se mezcla bien, esta debe ocupar máximo las $\frac{3}{4}$ partes del recipiente



Foto 10

Se deja macerar por 7 días, y se agita 15 minutos, dos veces al día



Foto 11

Se filtra el macerado usando la bomba de vacío, con papel de filtro



Foto 12

Extracto se concentra en un rotavapor



Foto 13

El concentrado se lleva a una estufa de circulación



Foto 14

El secado da un producto llamdo extracto blando

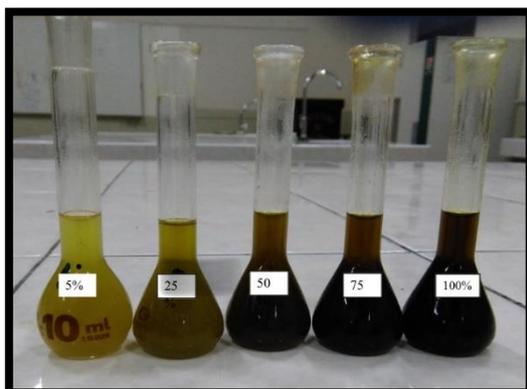


Foto 15

Se preparan las concentraciones de 5%, 25%, 50%, 75%, 100%, disueltas en etanol



Foto 15

Los extractos se filtran para esterilizarlos y se colocan en frascos de vidrio de color ámbar

Determinación de Concentración mínima inhibitoria



Foto 16

En tubos de 15x100ml se prepara la mezcla del extracto etanolico 0.4ml y el inculo bacteriano preparado 0.2ml



Foto 17

Los tubos se colocan en la jarra de Gaspak en microanaerobiosis, luego se coloca en la estufa por 24 horas



Foto 18

Se coloca 0.1ml de la dilución de cada uno de los tubos de ensayo en placas Petri con agar ST



Foto 19

Se extiende la dilución en todas las direcciones de la placa Petri



Foto 20

Se cultiva en microanaerobiosis y posteriormente a la estufa por 24 horas



Foto 21

Placas Petri a las 24 horas listas para su lectura (Técnica de macrodilución en caldo)

Determinación de Susceptibilidad bacteriana



Foto 22

Utilizando el método de difusión de discos, se sumergen discos en cada una de las concentraciones del extracto etanólico



Foto 23

Se colocan los discos embebidos en los extractos en las placas Petri sembradas con inoculo



Foto 24

Se realiza 10 repeticiones por cada concentración



Foto 25

Incubación en cámara de anaerobiosis en la jarra de Gaspac y en microanaeribiosis en la estufa a 37°C durante 24 horas



Foto 26

Placas Petri a las 24 horas listas para la lectura (Método de Kirby Bauer)