

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



Efecto antimicrobiano de un gel experimental a base de extracto etanólico de salvia frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* – Estudio *in vitro*.

TESIS

Para optar por el Título Profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Laura Angela Huanca Cáceres (0000-0002-7110-5892)

ASESOR

Mg. Ytala Yasmin Meléndez Condori (0000-0002-3154-8680)

Tacna, abril de 2024

DEDICATORIA

A mi familia, Gustavo, Megan y Gaela, por su sacrificio y apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre presente en cada momento de vida.

A mi esposo Gustavo, por estar siempre a mi lado y haberme apoyado durante el estudio de esta hermosa carrera.

A los docentes de las diferentes áreas de la Escuela Profesional de Odontología de la UPT; por su aprecio, enseñanza y experiencia transmitida a lo largo de mi carrera.

A mi asesora de Tesis Mg. Ytala Meléndez, por sus consejos y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación.

A los Dres. César Juárez, Marco Sánchez y a la Mg. Karina Portugal por sus comentarios y sugerencias que fueron de gran importancia en la realización del presente trabajo de investigación.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto de un gel experimental a base de extracto etanólico salvia frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Material y Métodos: Se realizó un estudio experimental in vitro. Se empleó el programa G*power 3.1.9.7, para el cálculo de las repeticiones. La salvia fue proveniente del departamento de Puno. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de salvia se utilizó el método difusión en disco, así mismo, se identificó la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida. En a base a ello, se preparó el gel experimental y se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica.

Resultados: El gel experimental a base de extracto etanólico de salvia inhibió el crecimiento de *C. albicans* y *S. aureus*, con halos de inhibición de 20.637 ± 0.508 mm y 15.307 ± 0.397 mm. Cuando se comparó los resultados del gel experimental con el Miconazol gel 2%, en el caso de *C. albicans*, el efecto antifúngico fue similar ($p > 0,05$), así mismo, para *S. aureus* se utilizó como control Perio Aid gel 0.12%, demostrando tener diferencias significativas.

Conclusiones: El gel experimental a base de extracto etanólico de salvia demostró tener un efecto antibacterial y antifúngico frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Palabras clave: antibacterianos, antifúngicos, salvia, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobial effect of an experimental gel based on ethanolic extract of sage against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* – In vitro study.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of an experimental gel based on sage ethanolic extract against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

Material and Methods: An in vitro experimental study was carried out. The G*power 3.1.9.7 program was used to calculate the repetitions. The sage came from the department of Puno. To evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract of sage, the disk diffusion method was used; likewise, the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration were identified. Based on this, the experimental gel was prepared and the antibacterial and antifungal activity was evaluated.

Results: The experimental gel based on ethanolic extract of sage inhibited the growth of *C. albicans* and *S. aureus*, with inhibition zones of 20.637 ± 0.508 mm and 15.307 ± 0.397 mm. When the results of the experimental gel were compared with Miconazole gel 2%, in the case of *C. albicans*, the antifungal effect was similar ($p > 0.05$), likewise, for *S. aureus* Perio Aid gel 0.12% was used as a control, proving to have significant differences.

Conclusions: The experimental gel based on ethanolic extract of sage demonstrated to have an antibacterial and antifungal effect against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

Keywords: antibacterials, antifungals, salvia, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*.

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo, Laura Angela Huanca Cáceres, en calidad de Bachiller de la Escuela Profesional de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, identificado con DNI 44651795, declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

“Efecto antimicrobiano de un gel experimental a base de extracto etanólico de salvia frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* – Estudio *in vitro*.”

Asesorada por Mg. Ytala Yasmin Meléndez Condori, la cual presente para optar el: Título Profesional de Cirujano Dentista.

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, habiéndose respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra los derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a La Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra.

En consecuencia, me hago responsable frente a La Universidad de cualquier responsabilidad que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello a favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de nuestra acción se deriven, sometiéndonos a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.



DNI: 44651795
Fecha: 24/05/2024

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN	10
II. MATERIAL Y MÉTODOS	12
II.1. Diseño del estudio	12
II.2. Tipo de investigación	12
II.3. Unidad de estudio.....	12
II.4. Tamaño de muestra	12
II.5. Criterios de selección	13
II.6. Cuadro de operacionalización de variables.....	14
II.7. Técnicas y procedimientos	15
II.7. Análisis de datos.....	20
III. RESULTADOS	20
IV. DISCUSIÓN	26
V. CONCLUSIONES	28
VI. REFERENCIAS	29
VII. ANEXOS	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Determinación de compuestos fenólicos por cromatografía líquida HPLC.....	20
Tabla 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de salvia en sus diferentes volúmenes frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 por el método de difusión de disco (Kirby-Bauer).....	21
Tabla 3. Actividad antifúngica del extracto etanólico de salvia en sus diferentes volúmenes frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 por el método de difusión de disco (Kirby-Bauer).....	22
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto etanólico de salvia frente a <i>S. aureus</i> y <i>C. albicans</i>	23
Tabla 5. Actividad antibacteriana del gel experimental a base de extracto etanólico de salvia.....	23
Tabla 6. Actividad antifúngica del gel experimental a base de extracto etanólico de salvia.....	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración del extracto etanólico de salvia en los diferentes volúmenes.....	18
---	----

I. INTRODUCCIÓN

La estomatitis subprotésica es una lesión inflamatoria limitada a la mucosa bucal, ocasionada generalmente, por una prótesis removible mal adaptada¹, esta lesión es muy frecuente, pues afecta aproximadamente al 50% de pacientes portadores de una prótesis dental². Dentro de los factores etiológicos comunes que contribuyen al desarrollo de la estomatitis subprotésica se encuentran, una higiene bucal deficiente, procesos alérgicos, sistemas inmunodeprimidos, mala calidad del material protésico, la edad avanzada y el sexo^{3,4,5}.

La mala higiene bucal trae consigo la proliferación de microorganismos oportunistas, tales como bacterias y hongos, que a su vez son favorecidos por el uso de prótesis mal adaptadas ya que en ellas se crea un reservorio a causa de la descomposición de alimentos, facilitando así su desarrollo^{6,7}.

De acuerdo a investigaciones realizadas en pacientes con estomatitis subprotésica se puede evidenciar que los microorganismos hallados comúnmente son *C. albicans* y *S. aureus*^{8,9}. Baena *et al.*¹⁰ demostraron que además de la presencia de estos microorganismos existe una asociación entre bacterias y hongos, tal es el caso de Staphylococcus-Candida, en pacientes con lesiones causadas por prótesis mal adaptadas, que aunado a la etiología multifactorial de la enfermedad hace que el manejo terapéutico sea un tanto complejo.

Actualmente se han realizado investigaciones sobre el uso de algunas plantas medicinales capaces de hacer frente a los microorganismos responsables de la estomatitis subprotésica, como el trabajo desarrollado por Shui *et al.*¹¹ en la que además señalan que las hierbas medicinales poseen menos efectos secundarios y más satisfacción del paciente que los antimicóticos y/o antibacteriales usados comúnmente. Así mismo en otros estudios realizados por Flores¹² y Carvajal¹³ se demostró que algunos microorganismos patógenos orales tales como *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* son susceptibles a extractos etanólicos de plantas medicinales.

Una de las plantas medicinales utilizadas en medicina tradicional es la que se conoce por su nombre vulgar como “Salvia”, “Puna salvia” o “Salvia andina”, la cual pertenece a la familia Lamiaceae y dentro de ella, al género *Lepechinia* y está compuesta de 40 a 42 especies¹⁴. En Sudamérica se encuentra localizada en la zona andina a una altura que va desde los 2500 a 4000 m.s.n.m., es así que los andes constituyen un importante hábitat para ellas. En el Perú

se cuenta con especies presentes en Ayacucho, Ancash, Apurímac, Ayacucho, Huánuco, Huancavelica, Junín, Cusco y Puno principalmente¹⁵.

El extracto metanólico de salvia ha demostrado tener una inhibición de crecimiento frente *Candida tropicalis*, *Candida krusei* y *Candida albicans* y ser rico en flavonoides y taninos¹⁶. Córdova-Guerrero *et al.*¹⁷ evaluaron el efecto antibacteriano y antifúngico de un extracto hexánico procedente de la raíz de *Salvia apiana* frente a patógenos de importancia clínica obteniendo como resultado una inhibición en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Por esta razón el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de un gel experimental a base de extracto etanólico salvia frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. Diseño del estudio

El presente estudio se trató de un diseño experimental *in vitro*, pues se manipuló la variable independiente mediante diferentes volúmenes 1000 μ l, 750 μ l, 500 μ l, 250 μ l, 100 μ l del extracto etanólico de salvia, además se logró realizar comparaciones con un control positivo (Clorhexidina 0.12% Perio·Aid® gel y Miconazol 2% (20mg/g) Daktarin® gel oral) en cada caso. Todo este procedimiento se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

II.2. Tipo de investigación

El estudio fue de tipo experimental porque permitió manipular la variable independiente y valorar el efecto que este tuvo sobre la variable dependiente estableciendo una relación de causalidad. Fue prospectivo, ya que los datos fueron recolectados a medida que ejecutemos la investigación y por lo tanto son propios de esta investigación. Así mismo el estudio fue transversal, porque las variables se midieron una sola vez, en un tiempo determinado y fue analítico, pues se manejó más de una variable y se logró encontrar la respuesta a la hipótesis planteada.

II.3. Unidad de estudio

La unidad de estudio fueron los discos de sensibilidad cargados con los diferentes volúmenes 1000 μ l, 750 μ l, 500 μ l, 250 μ l, 100 μ l del extracto etanólico de salvia.

II.4. Tamaño de muestra

Para calcular el tamaño de la muestra se utilizó el programa G*power 3.1.9.7 (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf, Germany), empleando la prueba de análisis de varianza ANOVA de defectos fijos. Se consideró un tamaño del efecto de 0.86, un error α de 0.05 y un poder de 0.80, teniendo un cálculo final de muestras de 24 elementos (Anexo N°1), es decir 4 repeticiones como mínimo por cada muestra. Para dicho cálculo se utilizó los datos del

artículo titulado “Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population”¹⁸. Como medida de contingencia se trabajó con un total de 96 muestras, es decir 8 repeticiones por cada grupo (1000 µl, 750 µl, 500 µl, 250 µl, 100 µl, control) frente a *S. aureus* y *C. albicans* respectivamente.

II.5. Criterios de selección

Criterios de inclusión:

- Placas con siembra adecuada del microorganismo.
- Discos de sensibilidad con halos de inhibición mayores a 14 mm.

Criterios de exclusión:

- Placas Petri con agar mal manipulados o preparados sin las instrucciones del fabricante.
- Placas Petri con cultivos contaminadas con otros agentes microbianos.

II.6. Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	VALOR FINAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
V. Independiente: Gel experimental de salvia	Producto utilizado para detener la propagación de gérmenes	Formulación de una sustancia a base de extracto etanólico de salvia	Extracto etanólico de salvia	Extracto etanólico de salvia 1000 µl, 750 µl, 500 µl, 250 µl, 100 µl	Cualitativa	Ordinal
V. Interviniente Cepa bacteriana/fúngica	Microorganismos descendientes de una única célula o que provienen de una determinada muestra en particular	Unidad bacteriana en la cual se va a experimentar	Tipo de microorganismo	<i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i>	Cualitativa Dicotómica	Nominal
V. Dependiente: Actividad antimicrobiana	Capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos	Actividad antibacteriana (halo de inhibición formado)	Técnica difusión en disco	mm	Numérica continua	Razón

		Concentración mínima en la cual se produce un efecto inhibitorio CMI	CMI	mg/ml	Numérica continua	Razón
		Concentración mínima en la cual se produce un efecto bactericida (CMB) y fungicida (CMF)	CMB/CMF	UFC	Numérica discreta	Razón

II.7. Técnicas y procedimientos

La técnica de recolección de datos que se utilizó en el presente estudio fue la observación, así mismo el instrumento que se empleó fue un vernier digital de acero 6" marca Truper. Para el registro de los datos obtenidos se hizo uso una ficha de recolección de datos, la cual fue aprobada en coordinación con el asesor del proyecto. (Anexo 2).

- Calibración de instrumento

La calibración del vernier digital de acero 6" marca Truper fue realizado por el mismo software del equipo.

- Prueba piloto previo a la ejecución

Se realizó una prueba piloto previo al estudio en la cual se utilizó 50 ml de la muestra filtrada de salvia que previamente fue macerada en alcohol de 70° y se procedió a su desecado por 24 horas, obteniéndose así 0,7 gramos de polvo de extracto etanólico, el cual fue disuelto con dimetilsulfóxido (DSMO). Para trabajar con cantidades menores, pero a la misma

concentración se hizo una regla de tres simple y se trabajó con 14 mg de extracto etanólico de salvia disuelto en 1ml de DMSO. Además, las cepas previamente activadas fueron sembradas en agar Müller Hinton y se procedió a colocar los discos de sensibilidad, previamente desnaturalizados, embebidos en el extracto etanólico de salvia al 100% (1000 µl). Se procedió a incubar a 35 ± 2 °C por 24 horas, luego de este tiempo se obtuvo halos de inhibición con un promedio de 19.375 mm y 24.065 mm para *S. aureus* y 56.885 mm y 53.905 mm para *C. albicans*, evidenciándose así la capacidad antimicrobiana del extracto etanólico de salvia y corroborando los pasos para el procedimiento.

- Recolección y extracción etanólica de la salvia

La muestra fue procedente del distrito de Arapa de la provincia de Azángaro del departamento de Puno y fue identificada taxonómicamente como *Lechepinia Meyenii* (walp.) Epling “Salvia” por el Herbario Takana de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann (Anexo 3). La cantidad recolectada fue 7 kg de planta entera fresca y se procedió a su secado al aire en un ambiente oscuro por una semana, posterior a eso se realizó su pulverización mediante un moledor manual y se procedió a su almacenamiento en un frasco de vidrio oscuro con alcohol al 70% a 30 °C durante 45 días agitándolo 3 veces por día durante 15 min, luego de ese tiempo se procedió a su biofiltración a través de papel filtro Whatman No. 2. Una vez obtenido la filtración se procedió al desecado en una estufa a 45 °C por 24 horas, obteniéndose así la extracción etanólica en polvo de la salvia la cual se almacenó para su posterior uso^{18, 19}.

- Cromatografía líquida de alta eficiencia del extracto etanólico de salvia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) permitió la separación, identificación y determinación de los componentes químicos del extracto etanólico de salvia, dichos procesos abarcaron varias técnicas separativas para analizar los constituyentes presentes²⁰. Para este análisis fisico-químico se envió una muestra de extracto etanólico de salvia bajo condiciones adecuadas a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, con sede en la ciudad de Cusco, Perú.

- Obtención de cepas liofilizadas y medios de cultivo

La cepa de *S. aureus* ATCC 6538 y *C. albicans* ATCC 10231, así como los medios de cultivo, se obtuvieron del laboratorio Gen Lab.

- Activación de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana de *S. aureus* ATCC 6538 fue reactivada en agar base sangre, mediante siembra por agotamiento y se incubó a 35 ± 2 °C por 24 a 48 horas en condiciones aeróbicas. Luego se replicó en viales con agar nutritivo y se incubó a 35 ± 2 °C por 24 horas, posterior a esto se sembró por suspensión en caldo BHI y se incubó a 30 °C por 24 horas, finalmente se sembró por el método de estría por agotamiento en viales con agar nutritivo y se incubó a 35 ± 2 °C por 24 horas²¹.

- Activación de la cepa fúngica

La cepa bacteriana de *C. albicans* ATCC 10231 fue reactivada en agar Sabouraud dextrosa, mediante siembra por agotamiento y fue incubado a 25 °C por 48 horas en condiciones aeróbicas. Luego se replicó en viales con agar papa dextrosa (PDA) y se incubó a 35 ± 2 °C por 24 horas, posterior a esto se sembrarán por suspensión en caldo BHI y se incubarán a 35 ± 2 °C por 24 horas, finalmente se sembrará por el método de estría por agotamiento en viales con PDA y se incubará a 35 °C por 24 horas²¹.

- Preparación de discos de sensibilidad

Para la presente investigación se utilizó discos de la marca OXOID, tubo por 50 unidades, con un diámetro de 6 mm, suficiente para contener los volúmenes de trabajo del extracto etanólico de salvia. Los discos fueron desnaturalizados por autoclave a 121°C durante 15 minutos a 15 libras de presión. Luego se procedió al secado en horno a 180 °C por 30 minutos.

Cuadro 1. Concentración del extracto etanólico de salvia en los diferentes volúmenes

N° de Tratamiento	Volumen (µl)	Concentración (mg)
1	1000	14
2	750	10.5
3	500	7
4	250	3.5
5	100	1.4

- **Actividad antibacteriana del extracto etanólico de salvia**

Se utilizó la técnica de difusión de discos de Kirby-Bauer, para lo cual las colonias activadas y puras de cada microorganismo se suspendieron en caldo BHI y se incubaron a 35 ± 2 °C por 2 a 3 horas, luego se comparó por el método de turbidimetría de escala de McFarland hasta que coincidiera con el tubo número 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/ml)²². Una vez obtenida esta muestra se procedió a sembrarlas en agar Müller Hinton por la técnica de superficie. Los discos de sensibilidad se impregnaron con cada uno de los volúmenes de extracto etanólico de salvia (1000 µl, 750 µl, 500 µl, 250 µl, 100 µl) luego se dejaron por un espacio de 5 minutos y se colocaron en la superficie de la placa de agar inoculada con el microorganismo. Luego las placas se incubaron según los requerimientos para cada microorganismo. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo las zonas de inhibición en milímetros con un Vernier digital (Truper)^{18, 22, 23}.

- **Determinación de la CMI por Microdilución**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó a partir de los volúmenes donde los halos de inhibición se consideraron sensibles, es decir halos mayores a 14 mm, en los cuales se realizó una microdilución, empleando una microplaca de ELISA sin anticuerpo de 96 pozos con una capacidad de 200 µl en cada pozo, se procedió a sembrarlos en caldo BHI. Posterior a eso fueron incubados por 24 horas a 35 ± 2 °C y se procedió a observar los

cambios en la turbidez. La concentración mínima inhibitoria fue la concentración más baja en la que el extracto etanólico inhibió el crecimiento del microorganismo, las experiencias se realizaron por quintuplicado¹⁸.

- Determinación de la CMB y CMF

A partir de la CMI se procedió a sembrarlos en agar Müller Hilton por un espacio de 24 horas a 35 ± 2 °C, por el método de superficie, haciendo lectura a las 24 horas y evidenciando que en las placas se halla eliminado el 99% de bacterias y hongos, según cada caso. Las experiencias se realizaron por triplicado¹⁸.

- Formulación del gel a base de extracto etanólico de salvia

Para la preparación de 500 ml de gel se agregó en un vaso de precipitado 5 g carbopol 940, 2.5 g benzoato de sodio y 3.8 ml de trietanolamina, se fue mezclando hasta obtener la consistencia del gel. Después de ello se agregó la 50 g de glicerina, 50 g propilenglicol y por último se agregó 1.8 g del extracto etanólico de salvia para *Candida albicans* (ATCC 10231). El mismo procedimiento se realizó para el gel frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) en la que se utilizó 0.6 g del extracto etanólico de salvia.

- Actividad antimicrobiana del gel a base de extracto etanólico de salvia

Se utilizó el método de difusión de discos de Kirby-Bauer, para lo cual se impregnaron discos con el gel formulado a base de extracto etanólico de salvia y se colocaron sobre las placas con agar Müller Hilton inoculadas con *C. albicans* (ATCC 10231) y *S. aureus* (ATCC 6538) respectivamente, así también los discos control según sea el caso. Posterior a esto fueron incubados por 24 horas a 35 ± 2 °C. Luego las zonas de inhibición de crecimiento bacteriano/fúngico alrededor de los discos con gel experimental a base de extracto etanólico de salvia y del gel control (Clorhexidina 0.12% Perio-Aid y Miconazol 2% Daktarin), se midieron en milímetros con un Vernier digital (Truper)^{18, 22, 23}.

II.7. Análisis de datos

Terminada la recolección de datos, se procedió a su sistematización en el programa Microsoft® Excel® 2019. Para la descripción de los datos se utilizó una estadística descriptiva, mediante sus medidas de resumen por ser una variable numérica. Luego, para el contraste de la hipótesis se hizo uso de una estadística inferencial, estableciendo un nivel de significancia del 5%. Para lo cual se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks y así corroborar la distribución normal de los datos, además los datos correspondientes a los halos de inhibición fueron sometidos a la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey empleando el software SPSS v.22.0.

III. RESULTADOS

La caracterización química del extracto etanólico de salvia se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPCL) y reacciones a la gota (Anexo 4), donde se reveló la presencia de abundantes compuestos fenólicos principalmente ácido rosmarínico.

Tabla 1. Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

Extracto etanólico de salvia	TR	Repeticiones			Promedio
		1	2	3	Ácido Cafeico mg/100ml
Ácido Rosmarínico	17.317	41.67	41.96	41.85	41.83
Total Fenólicos		51.97	52.48	52.20	52.22

TR= Tiempo de retención en minutos (cromatograma)

Tabla 2. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de salvia en sus diferentes volúmenes frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 por el método de difusión de disco (Kirby-Bauer)

Volumen	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	DS
Vol. 100 µl	8	1.585	10.24	11.825	11.269	0.551
Vol. 250 µl	8	2.645	15.625	18.27	17.258	0.989
Vol. 500 µl	8	1.07	19.7	20.77	20.228	0.413
Vol. 750 µl	8	2.615	22.26	24.875	23.561	1.037
Vol. 1000 µl	8	4.525	23.13	27.655	25.729	1.571
DSMO	8	-	-	-	-	-

DS= Desviación estándar

Interpretación:

En la Tabla 2 se puede observar que entre los volúmenes 100 µl y 250 µl el extracto etanólico comienza a mostrar un efecto antibacteriano, pues el diámetro de los halos de inhibición se acerca a 15 mm, además que el diluyente utilizado (DSMO) no presentó resultados, por lo tanto, no interfirió en la obtención de los datos.

Tabla 3. Actividad antifúngica del extracto etanólico de salvia en sus diferentes volúmenes frente a *Candida albicans* ATCC 10231 por el método de difusión de disco (Kirby-Bauer)

Volumen	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	DS
Vol. 100 µl	8	1.92	9.29	11.21	9.934	0.739
Vol. 250 µl	8	1.375	10.675	12.05	11.539	0.466
Vol. 500 µl	8	0.815	13.51	14.325	13.767	0.254
Vol. 750 µl	8	1.76	15.915	17.675	16.706	0.677
Vol. 1000 µl	8	3.39	20.415	23.805	22.19	1.084
DSMO	8	-	-	-	-	-

DS= Desviación estándar

Interpretación:

En la Tabla 3 se puede observar que entre los volúmenes 500 µl y 750 µl el extracto etanólico comienza a mostrar un efecto antifúngico, pues el diámetro de los halos de inhibición supera los 14 mm, además que el diluyente utilizado (DSMO) no presentó resultados, por lo tanto, no interfirió en la obtención de los datos.

Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto etanólico de salvia frente a *S. aureus* ATCC 6538 y *C. albicans* ATCC 10231

Microorganismo	CMI (mg/ml)	CMB/CMF (mg/ml)	UFC (Media)
<i>S. aureus</i>	2.6	3.2	6.3
<i>C. albicans</i>	8.5	8.9	3.3

Interpretación:

En la tabla 4 se muestra que la CMI del extracto etanólico de salvia fue 2.6 mg/ml (vol. 185.7 µl) para *S. aureus* (ATCC 6538) y 8.5 mg/ml (vol. 607.14 µl) para *C. albicans* (ATCC 10231), dichas concentraciones no evitaron la formación de UFC pues muestran una media de 6.3 y 3.3 respectivamente.

Tabla 5. Actividad antibacteriana del gel experimental a base de extracto etanólico de salvia

Valor	<i>S. aureus</i>		
	GE*	C+*	C-
N	5	5	5
RANGO	0.965	1.125	-
MÍNIMO	14.635	11.74	-
MÁXIMO	15.6	12.865	-
MEDIA	15.307	12.366	-
MEDIANA	15.4650	12.4600	-
DS	0.39696	0.45477	-
IC 95% INF	14.8141	11.8013	-
IC 95% SUP	15.7999	12.9307	-

$P < 0.05$

GE* = Gel experimental 3.2 mg/ml C+* = Control positivo Perio Aid gel 0.12%

C- = Control negativo agua destilada estéril DS = Desviación estándar

Interpretación:

La tabla 5 muestra la actividad antibacteriana del gel experimental frente a *S. aureus*, pues en este estudio se observaron diferencias significativas entre los halos de inhibición para el gel experimental a base de extracto etanólico de salvia y el control positivo (Perio Aid gel 0.12%) y el negativo (agua destilada estéril).

Tabla 6. Actividad antifúngica del gel experimental a base de extracto etanólico de salvia

Valor	<i>C. albicans</i>		
	GE**	C+**	C-
N	5	5	5
RANGO	1.195	0.895	-
MÍNIMO	20.17	19.56	-
MÁXIMO	21.365	20.455	-
MEDIA	20.637	20.022	-
MEDIANA	20.4200	19.9100	-
DS	0.50847	0.4077	-
IC 95% INF	20.0056	19.5158	-
IC 95% SUP	12.9307	20.5282	-

$P > 0.05$

GE**= Gel experimental 8.9 mg/ml C+** = Control positivo Miconazol gel 2%

C- = Control negativo agua destilada estéril DS= Desviación estándar

Interpretación:

La tabla 6 muestra la actividad antifúngica del gel experimental frente a *C. albicans* (ATCC 10231), pues en este estudio se observaron diferencias significativas entre los halos de inhibición para el gel experimental a base de extracto etanólico de salvia y el control negativo (agua destilada estéril). Cuando se comparó los resultados del gel experimental con el Miconazol gel 2%, por medio de la prueba de Tukey, el efecto antifúngico fue similar ($p > 0,05$).

CONTRASTE DE HIPÓTESIS

- H0: Los halos de inhibición presentan una distribución normal
- H1: Los halos de inhibición no presentan una distribución normal

Para comprobar la hipótesis de normalidad se realizó la prueba de Shapiro-Wilk, con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, obteniendo un p - valor = 0.089 para *S. aureus* (ATCC 6538) y un p - valor = 0.370 para *C. albicans* (ATCC 10231). Es así que no rechazamos la H0, por lo tanto, podemos decir que nuestros datos se distribuyen de manera normal, es por eso que utilizamos la prueba paramétrica de ANOVA, para demostrar la diferencia de medias entre los grupos estudiados. Para ello se planteó las siguientes hipótesis:

- H1: El gel experimental a base de extracto etanólico de salvia, presenta un efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.
- H0: El gel experimental a base de extracto etanólico de salvia, no presenta un efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Obteniendo como resultado una significancia de 0.00 para *S. aureus* (ATCC 6538) y *C. albicans* (ATCC 10231) en ambos casos, por lo tanto, rechazamos la hipótesis nula y aceptamos la hipótesis alterna.

IV. DISCUSIÓN

La “Salvia”, “Puna salvia” o “Salvia andina” es una planta medicinal, aromática perteneciente a la familia Lamiaceae y al género *Lepechinia*, dentro de sus propiedades destacan su poder antibacteriano, antifúngico, virostático y antiinflamatorio, esto debido a la presencia de terpenoides¹⁴.

En este estudio, el análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) del extracto etanólico de salvia evidenció la presencia de abundantes compuestos fenólicos principalmente ácido rosmarínico, además de flavonoides, taninos, triterpenos y esteroides. Esto nos permitió tener una valoración cualitativa de los principales constituyentes de esta planta; pues en estudios realizados por Huaraca *et al.*¹⁴ y Sánchez *et al.*²⁴ se reportó metabolitos secundarios similares.

S. aureus y *C. albicans* son los principales colonizadores de la estomatitis sub protésica^{8,9} en ese sentido el extracto etanólico de salvia demostró tener un efecto inhibitorio frente a dichos microorganismos, mostrando halos de inhibición que van desde 10.24 mm a 27.65 mm para *S. aureus* y halos que van desde 9.29 mm a 23.80 mm para *C. albicans* en concentraciones de 1.4 mg/ml a 14 mg/ml para ambos microorganismos. Resultados similares fueron encontrados en la investigación realizada por Córdova-Guerrero *et al.*¹⁷ donde obtuvieron halos de inhibición en un rango de 10 a 24 mm para *S. aureus* y de 8 mm a 13 mm para *C. albicans* en una concentración de 27 mg/ml y 3.37 mg/ml de extracto hexánico de salvia respectivamente, si bien es cierto, fueron similares para *S. aureus*, sin embargo se debe tener en cuenta que en dicho estudio se trabajó con una mayor concentración. Así también en la investigación realizada por Pierozan *et al.*²⁶ sobre varias especies de salvia como *S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. sclarea* y *S. Triloba*, se evaluó la CMI de bacterias gram negativas y gram positivas, dentro de ellas a *S. aureus*, donde obtuvieron una CMI a 2.31 mg/ml, y además señalaron que los microorganismos gram positivos presentan mayor sensibilidad a los aceites esenciales de salvia, al comparar con nuestros resultados podemos afirmar, que la CMI del extracto etanólico de salvia, posee efecto similar al aceite esencial de salvia. Así mismo Sookto *et al.*²⁵ en un estudio realizado sobre el aceite esencial de hojas

de la especie *S. officinalis* L. demostraron que dicha planta tiene efectos inhibidores y fungicidas frente a las cepas de prueba de *C. albicans* a una concentración de 2.78 g/l, en nuestro estudio realizado en base a extracto etanólico de salvia se puede evidenciar que dichos efectos ocurren a una menor concentración.

Además, los resultados obtenidos en esta investigación para el análisis de varianza para los p - valores menores a 0,05, indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos de estudio. Es decir, el gel experimental a base de extracto etanólico de salvia, presenta un efecto antimicrobiano frente a *S. aureus* y *C. albicans*. Así mismo cuando se comparó los resultados del gel experimental con el Miconazol gel 2%, en el caso de *C. albicans*, el efecto antifúngico fue similar ($p > 0,05$), demostrando tener el mismo efecto al momento de inhibir el crecimiento de *C. albicans*. Siendo una opción para un posible empleo en el futuro como un agente terapéutico.

Este efecto antimicrobiano esta atribuido a los constituyentes como los flavonoides y los terpenoides pues están asociados a la desintegración de la membrana celular y a la alteración de la función celular microbiana²⁷.

Esta investigación se desarrolló in vitro, lo que permitió un manejo simplificado de las variables de estudio, desarrollando la evaluación del efecto antimicrobiano de los diferentes volúmenes y concentraciones del extracto etanólico de salvia frente a *S. aureus* y *C. albicans*. Sin embargo, es así que resulta difícil extrapolar los resultados a un modelo in vivo, y poder observar el efecto del gel experimental frente a la asociación Staphylococcus-Candida, en pacientes con estomatitis subprotésica¹⁰.

V. CONCLUSIONES

- Se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto etanólico de salvia a diferentes volúmenes por el método de difusión en disco, obteniendo halos de inhibición con un promedio de 11.269 mm a 25.729 mm para *S. aureus* (ATCC 6538) y 9.934 mm a 22.19 mm para *C. albicans* (ATCC 10231).
- Se determinó la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida/fungicida del extracto etanólico de salvia frente a *S. aureus* (ATCC 6538) y *C. albicans* (ATCC 10231).
- Se comparó el efecto antibacteriano del gel experimental a base de extracto etanólico de salvia contra la clorhexidina 0.12% Perio Aid en gel, obteniendo resultados significativos, demostrando así que el gel experimental posee un mayor efecto antibacterial.
- Se comparó el efecto antifúngico del gel experimental a base de extracto etanólico de salvia contra el Miconazol gel oral al 2%, obteniendo resultados no significativos evidenciando así, que ambos poseen efectos similares.
- Se determinó que el gel experimental a base de extracto etanólico de salvia presenta un efecto antimicrobiano a una concentración de 3.2 mg/ml y 8.9 mg/ml frente a *S. aureus* (ATCC 6538) y *C. albicans* (ATCC 10231) respectivamente.

VI. REFERENCIAS

1. León-Velastegui M, Gavilanes-Bayas N, Mejía-Navas E. Lesiones de la mucosa oral asociadas al uso de prótesis odontológicas en pacientes edéntulos totales. Dom Cien [internet]. 2019 [citado 14 de abril de 2023]; 5(1):603-23. Disponible en: <https://dominiodelasciencias.com/ojs/index.php/es/article/view/880>
2. Morales Y, Meras T, Batista M. Lesiones paraprotéticas de tejidos blandos en pacientes portadores de prótesis total. Medicentro Electrónica [Internet]. 2019 [citado 7 de junio de 2023]; 23(1): 19-25. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432019000100004&lng=es.
3. Piña I, Matos K, Barrera M, Gonzalez Y, Arencibia M. Factores de riesgo relacionados con las lesiones paraprotéticas en pacientes portadores de prótesis removibles. Medisan [internet]. 2021 [citado 15 de abril de 2023]; 25(1):41-50. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1029-30192021000100041&lng=es&nrm=iso&tlng=es
4. Ramírez M, Gómez R, Bravet A, Reyes A, Salso R. Algunos factores de riesgo asociados a la estomatitis subprótesis. Multimed [Internet]. 2019 [citado 14 de abril de 2023]; 23(2): 207-219. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-48182019000200207&lng=es.
5. Brantes M, Azevedo R, Rozza de Menezes R, Póvoa H, Tucci R, Gouvêa A, et al. Analysis of risk factors for maxillary denture-related oral mucosal lesions: A cross-sectional study. Med Oral Patol Oral Cir Bucal [internet]. 2019 [citado 16 de abril de 2023]; 24(3):e305-13. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6530958/>
6. Verma A, Arya D, Vikram S, Gupta P, Pathak A, Tripathi S. A study to evaluate etiology of denture stomatitis and to determine interrelationship with trauma and candida albicans

- count. *IP Annals of Prosthodontics and Restorative Dentistry* [internet]. 2021 [citado 15 de abril de 2023]; 7(3):151–156. Disponible en: <https://www.aprd.in/html-article/14771>
7. Rosales A, Fonseca M. Estomatitis subprótesis. Algunos factores de riesgo asociados. *Multimed* [Internet]. 2022 [citado 14 de abril de 2023]; 26(1): e2049. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-48182022000100011&lng=es. Epub 04-Ene-2022.
 8. Garbacz K, Kwapisz E, Wierzbowska M. Denture stomatitis associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: a case report. *BMC Oral Health* [internet]. 2019 [citado 15 de abril de 2023]; 19(1):219. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0910-6>
 9. Qiu J, Roza M, Colli K, Dalben Y, Maifrede S, Valiatti T, Novo V, Cayô R, Grão-Velloso T, Gonçalves S. *Candida*-associated denture stomatitis: clinical, epidemiological, and microbiological features. *Braz J Microbiol* [internet]. 2023 [citado 16 de abril de 2023]; 54(2):841-848. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10234952/>
 10. Baena T, Moreno V, Franco F, Aldape B, Quindós G, Sánchez L. Colonización por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans* en pacientes portadores de prótesis dentales *Candida albicans*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [internet]. 2005 [citado 15 de abril de 2023]; 10:E27-E39. Disponible en: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v10Suppl1i/medoralv10suppl1ip27.pdf>
 11. Shui Y, Li J, Lyu X, Wang Y. Phytotherapy in the management of denture stomatitis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother Res* [internet]. 2021 [citado 17 de mayo de 2023]; 35(8):4111-26. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.7073>
 12. Flores C. Efecto Antimicrobiano in Vitro de Extractos de *Caesalpinia Spinosa* (Algarrobo) sobre Patógenos Orales. *Rev Fac Odontol* [internet]. 2022 [citado 17 de mayo de 2023]; 37(85). Disponible en: <https://revista.odontologia.uba.ar/index.php/rfouba/article/view/121/145>

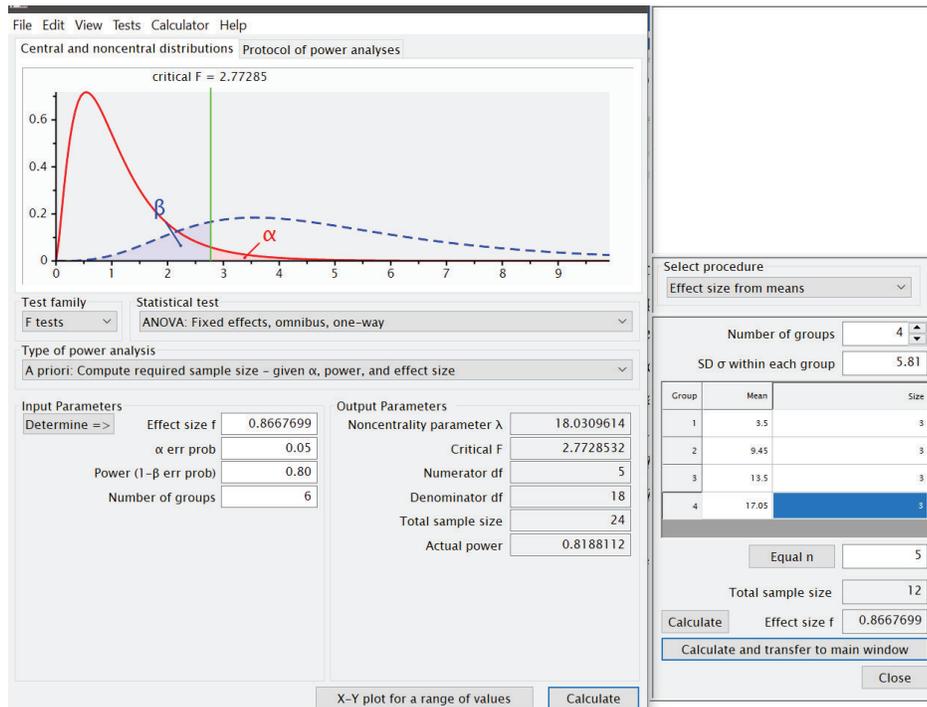
13. Carvajal A. Detección de metabolitos secundarios presentes en las hojas de (*Trichanthera gigantea*) Acanthaceae y su actividad antimicrobiana y antimicótica. *Acta Biol Colomb*. [internet]. 2023 [citado 17 de mayo de 2023]; 28(1), 118-127. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/abc.v28n1.89656>
14. Huaraca R, Delgado M, Tapia F, Nolasco G. Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú. *Rev. ALFA* [internet]. 2021 [citado 7 de junio de 2023]; 5(14):153-165. Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/pdf/arca/v5n14/2664-0902-arca-5-14-153.pdf>
15. Brako L, Raven P, Zarucchi J. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru = Catálogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú [Internet]. St. Louis, Mo. : Missouri Botanical Garden.,; 1993 [citado 28 de mayo de 2023]. 1336 p. Disponible en: <http://archive.org/details/mobot31753003155055>
16. Salari S, Bakhshi T, Sharififar F, Naseri A, Ghasemi Nejad Almani P. Evaluation of antifungal activity of standardized extract of *Salvia rhytidea* Benth. (Lamiaceae) against various *Candida* isolates. *J Mycol Médicale* [internet]. 2016 [citado 17 de mayo de 2023]; 26(4):323-30. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523316301287>
17. Córdova-Guerrero I, Aragon-Martinez O, Díaz-Rubio L, Franco-Cabrera S, Serafin-Higuera N, Pozos-Guillén A, *et al.* Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. *Rev Argent Microbiol* [internet]. 2016 [citado 17 de mayo de 2023]; 48(3):217-21. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116300487>
18. Hemeg H, Moussa I, Ibrahim S, Dawoud T, Alhaji J, Mubarak A, *et al.* Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi J Biol Sci* [internet]. 2020 [citado 29 de mayo de 2023] ;27(12):3221-7. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X20303624>
19. Galvez-Calla L, Alvarez-Páucar MA, Alcázar-Aguilar O, Mayta-Tovalino F, Lozano-Castro F, Cordova-Huayanay E, *et al.* Actividad antioxidante del gel a base de extracto

- de *Origanum vulgare* ¿Importante para la salud bucal? Estudio preliminar. *Rev Estomatológica Hered* [internet]. 2021 [citado 7 de junio de 2023]; 31(1):6-16. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1019-43552021000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
20. Suarez D, Morales Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Semilleros: Formación investigativa*. 2018 [citado 7 de junio de 2023]; 4(1): 7-14. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.11839/7731>
21. *Microbiologics: Recommended Culture Methods for Microorganisms*. [Internet]. 2022 Minnesota. [citado 12 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.microbiologics.com/Recommended-Culture-Methods>
22. Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). Estándares de Desempeño para Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana; Suplemento informativo vigésimo quinto [internet]. 2015 [citado 31 de mayo de 2023]; 35(3):1-236. Disponible en: https://clsi.org/media/tc4b1paf/m10033_samplepages-1.pdf
23. Sánchez-Tito M, Layme-Huanca M. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. frente a *Enterococcus faecalis*. *Rev Cuba Estomatol* [Internet]. 2022 [citado 12 de junio de 2023];59(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75072022000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
24. Sánchez E, Pérez A, Chávez D, Rodríguez C. Caracterización farmacognóstica de *Salvia officinalis* L. *Rev Cubana Plant Med* [Internet]. 2005 [citado 30 de noviembre de 2023]; 10(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962005000100005&lng=es.
25. Sookto T, Srithavaj T, Thaweboon S, Thaweboon B, Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2013

- [citado 7 de diciembre de 2023]; 3(5):376-80. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3642447/>
26. Pierozan M, Pauletti G, Rota L , Dos Santos A , Lerin L , Di Luccio M, Mossi A , Atti-Serafini L, Cansian R, Oliveira J. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of salvia L. species. Food Sci. Technol [Internet]. 2009 [citado 7 de diciembre de 2023]; 29(4): 764-770. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000400010>
27. Guimarães A, Meireles L, Lemos M, Guimarães M, Endringer D, Fronza M, Scherer R. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. Molecules. Molecules 2019 [citado 7 de diciembre de 2023]; 5;24(13):2471. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6651100/>

VII. ANEXOS

Anexo N° 1



Anexo N°2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha: 19/10/2023

T° de incubación: 35 ± 2 °C

Técnica de difusión de discos de Kirby y Bauer

S. aureus ATCC 6538	Halo de inhibición (mm)						
	Extracto etanólico de salvia					Diluyente DSMO	Disco desnaturalizado
	10%	25%	50%	75%	100%		
1	11.25	17.31	20.69	24.11	26.57	< a 6 mm	< 6
	11.21	17.43	20.85	25.46	28.24	< 6	< 6
2	11.86	18.19	20.70	22.56	25.13	< 6	< 6
	11.51	17.98	20.72	22.57	23.12	< 6	< 6
3	11.05	17.61	20.83	22.28	25.46	< 6	< 6
	11.00	17.69	20.37	22.24	26.45	< 6	< 6
4	10.61	17.03	20.39	21.96	27.41	< 6	< 6
	11.02	14.22	19.55	23.18	27.90	< 6	< 6
5	11.81	15.53	19.92	24.47	26.65	< 6	< 6
	11.50	16.43	19.48	24.05	26.36	< 6	< 6
6	10.12	16.89	20.01	22.63	26.11	< 6	< 6
	10.36	17.18	20.31	25.07	26.14	< 6	< 6
7	11.38	18.21	20.14	24.83	22.78	< 6	< 6
	11.97	17.88	20.03	24.92	23.48	< 6	< 6
8	11.91	18.80	19.31	22.58	24.92	< 6	< 6
	11.74	17.74	20.35	24.06	24.95	< 6	< 6

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Fecha: 19/10/2023

T° de incubación: 35 ± 2 °C

Técnica de difusión de discos de Kirby y Bauer

C. albicans ATCC 10231	Halo de inhibición (mm)						
	Extracto etanólico de salvia					Diluyente DSMO	Disco desnaturaliza do
	10%	25%	50%	75%	100%		
1	11.23	11.16	13.79	16.20	23.21	<6	<6
	11.19	11.50	13.67	15.88	21.59	<6	<6
2	10.82	11.67	13.78	16.37	24.15	<6	<6
	10.85	11.94	13.97	16.79	23.46	<6	<6
3	10.24	11.81	13.81	15.81	22.08	<6	<6
	10.13	11.79	13.80	16.02	22.43	<6	<6
4	9.57	12.07	14.01	16.98	23.63	<6	<6
	9.08	12.03	13.32	17.30	23.20	<6	<6
5	9.07	11.17	13.40	17.73	22.38	<6	<6
	9.51	11.00	13.62	17.62	21.53	<6	<6
6	9.36	10.74	13.51	18.41	21.86	<6	<6
	9.30	10.61	13.78	16.02	22.12	<6	<6
7	9.57	11.81	14.52	15.93	21.25	<6	<6
	9.84	11.73	14.13	15.98	21.32	<6	<6
8	9.65	11.86	13.79	17.23	20.72	<6	<6
	9.53	11.74	13.37	17.02	20.11	<6	<6

Anexo N°3



HERBARIO TAKANA (TKA)

Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann
Facultad de Ciencias
Ciudad Universitaria - Av. Miraflores s/n, Tacna - Perú



“Año del Bicentenario, de la consolidación de nuestra Independencia, y de la conmemoración de las heroicas batallas de Junín y Ayacucho”

Constancia N° 002 – TKA- 2024

EL DIRECTOR DEL HERBARIO TAKANA (TKA) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (hojas y flores) colectada por **Laura Angela Huanca Cáceres**, identificado con DNI N° 44651795, la estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna, cuya determinación taxonómica servirá para su proyecto de Tesis: "Efecto antimicrobiano de un gel experimental a base de extracto etanólico de salvia frente *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* – Estudio in vitro", ha sido estudiada y clasificada como: *Lepichinia meyenii* (Walp.) Epling y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION MAGNOLIOPHYTA

CLASE MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE ASTERIDAE

ORDEN LAMIALES

FAMILIA LAMIACEAE

GENERO *Lepechinia*

ESPECIE *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling

Nombre vulgar: "Salvia"

Determinado por: Bach. Cs. Biol. Javier Máximo Ignacio Apaza

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Tacna, 26 de febrero del 2024



Dr. PABLO JUAN FRANCO LEON
Director del Herbario (TKA)

cc: Herbario TKA

Anexo N°4



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Cusco 18 de Diciembre 2023⁻⁵⁵

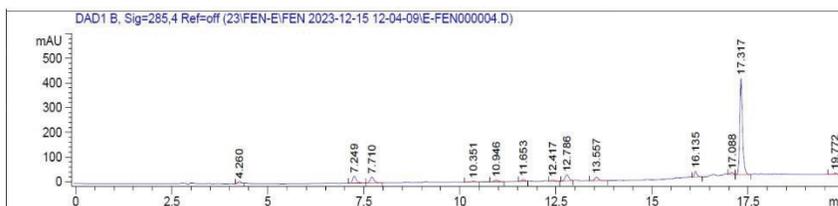
Solicitante : Laura Angela Huanca Cáceres
 Tipo de Análisis : Compuestos Fenólicos y marcha fitoquímica
 Método : Cromatografía Líquida HPLC y Reacciones a la gota
 Tipo de Muestras : Extracto etanólico de Salvia
 Cantidad de Muestra : 1 Tubo falcons conteniendo 15 mL aproximadamente
 Almacenamiento : 4 °C.

Extracto etanólico de Salvia	TR	Repeticiones			Promedio
		1	2	3	Ácido Cafeico mg/100 mL
Ácido Rosmarínico	17.317	41.67	41.96	41.85	41.83
Total Fenólicos		51.97	52.48	52.20	52.22

TR = Tiempo de retención en minutos (cromatograma)

Nota: Se ha identificado el Ácido Cafeico a 17.317 minutos mediante la comparación de los espectros UV de las señales de la muestra con la base de datos de espectros UV, la determinación se realizó mediante una curva de calibración del estándar de Ácido Cafeico el contenido total de los otros compuestos fenólicos se reporta como los equivalentes en miligramos de Ácido Cafeico presentes en 100 mililitros de muestra.

Cromatograma



Químico Jorge Chequenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Condiciones de Análisis por HPLC

Cromatógrafo: Agilent serie 1200
 Software: Chemstation V03.02
 Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150mm, 5um
 Pre Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5um
 Flujo de Columna: 0.6 ml/min.
 Solvente A: H₃PO₄ 0.1%
 Solvente B: Acetonitrilo
 Sistema de Análisis: Inicio 5 % de B, 10 min 20% de B, a 14 min 40% de B, a 18 min 50% de B, de 18 a 20 min 100% de B
 Detección DAD: 285, 330, 370 nm
 Temperatura del Horno: 40.0°C
 Tiempo de Análisis: 20 min.
 Volumen de Inyección: 1.0 µl

Referencia Consultada

- Ivanescu, B., Vlase, L., Corciova, A., & Lazar, M. I. (2010). HPLC-DAD-MS study of polyphenols from *Artemisia absinthium*, *A. annua*, and *A. vulgaris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(3), 468-470.
- Justesen, U., Knuthsen, P., & Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 799(1), 101-110. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01061-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01061-3)
- Sakakibara H, Honda Y, Nakagawa S, Ashida H, Kanazawa K. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *J Agric Food Chem*. 2003 Jan 29;51(3):571-81.
- Vrchotová, N & Sera, Božena & Triska, Jan. (2007). The stilbene and catechin content of the spring sprouts of *Reynoutria* species. *ACTA Chromatographica*. 19.
- Wang, L.H., and Li, W.H., 2007. General method for determining flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector, *Pharm. Chem. J.*, 41, 225–231




 Químico. Jorge Chequenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
 FACULTAD DE CIENCIAS
 LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
 AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Marcha Fitoquímica

Ensayo	Prueba	Extracto etanólico de Salvia
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	+++
Flavonoides	Shinoda	+
Alcaloides	Dragendorff	–
Triterpenos y Esteroides	Liebermann	+
Saponinas	Espuma	–
Taninos	Gelatina	++
Quinonas	Bontrager	–

Abundante = +++, Poco = ++, Muy Poco = +, Ausente = –

Nota:

El ensayo fitoquímico realizado al extracto consistió en reacciones de coloración y/o precipitación, en el que se evaluó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios

Referencia

- Lock de Ugaz O. 1994. "Investigación Fitoquímica Métodos en el estudio en los productos naturales" Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima.



Jorge Chequenaira Pari
 Químico, Jorge Chequenaira Pari
 Analista del Laboratorio de Cromatografía y
 Espectrometría – UNSAAC.
 CQP - 914

Anexo N°5

**Universidad Nacional "Jorge Basadre Grohmann" – Tacna**
FACULTAD DE CIENCIAS

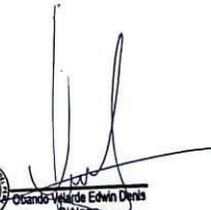
Escuela Profesional de: Biología-Microbiología, Física Aplicada y Matemática

**CONSTANCIA**

Se hace constar que el Bachiller de la Escuela de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada de Tacna Señorita **HUANCA CÁCERES, LAURA ANGELA** con código de matrícula N° 2016-054845 y con documento de Identidad N° 44651795 realizó la parte experimental de su tesis titulada. Efecto antimicrobiano de un gel experimental a base del extracto etanólico de salvia frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* estudio in vitro. Con fecha de inicio del 14 de julio del 2023 y finalizando el 03 de noviembre del 2023.

La presente se extiende a petición de la interesada para los fines que el estime al décimo primer día del mes de marzo del 2024.

Atentamente




Edwin Denis Obando Velarde
C.B.P. 16702
Biólogo – Microbiólogo
Especialista del laboratorio de Microbiología
Edwin Denis Obando Velarde
C.B.P. 16702

AVANCES DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

1. Recolección de planta (Salvia) – Procedente de Puno.



2. Secado de planta en ambiente oscuro por una semana.



3. Molienda de planta seca.



- Almacenamiento en frasco oscuro con alcohol de 70° por 45 días con agitación 3 veces al día.



- Filtrado y bifiltrado del extracto etanólico



6. Deseccación de 50 ml del extracto etanólico de salvia.



7. Extracción del principio activo.



8. Extracto etanólico a diferentes concentraciones



9. Preparación de medios y activación de cepas liofilizadas



10. Activación de cepas microbianas.

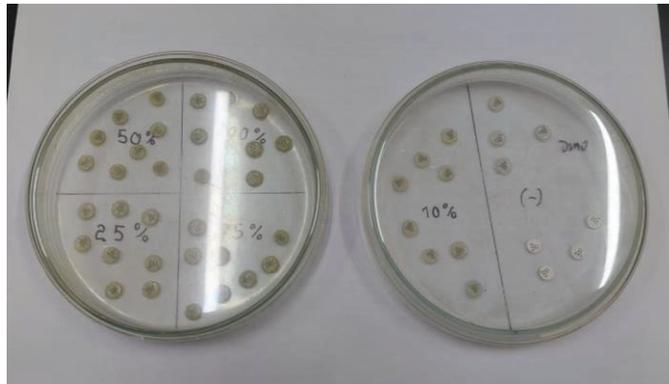


11. Desnaturalización de discos



12. Discos embebidos con las diferentes concentraciones del extracto etanólico




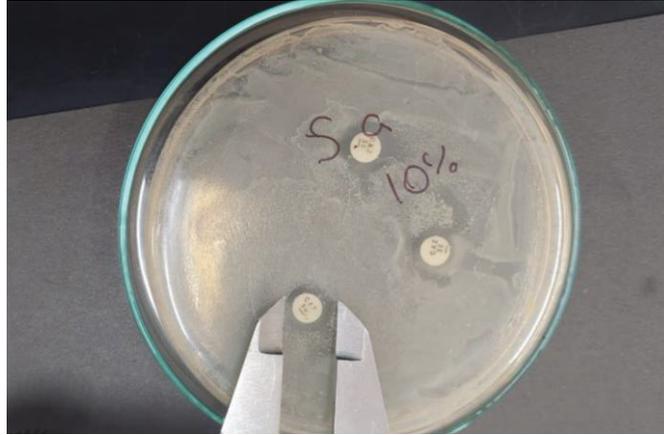


13. Siembra de microorganismos en agar Muller Hinton y método de difusión de disco

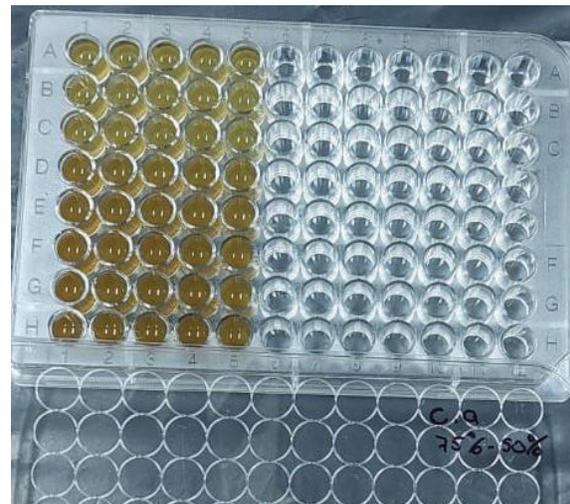


14. Medición de los halos de inhibición con vernier digital Truper.



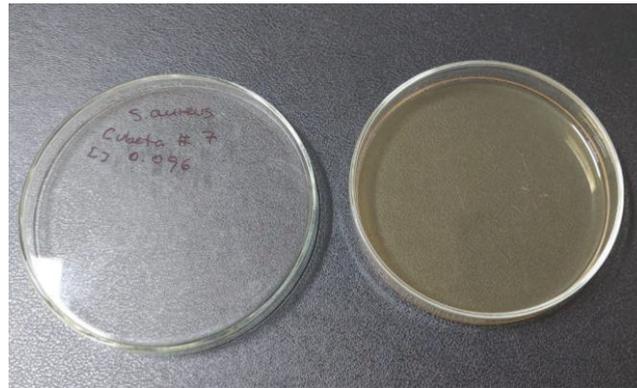
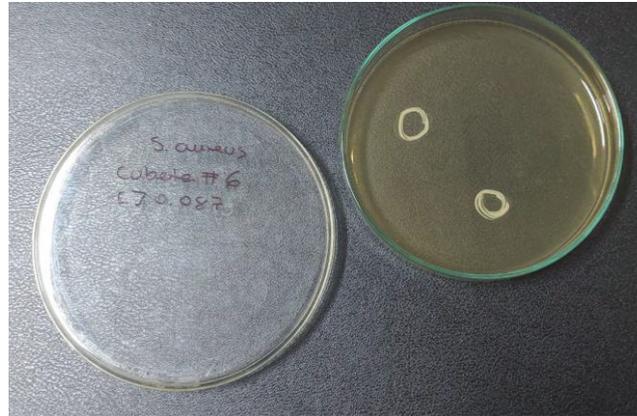


15. CMI



16. CMB





17. Halo de inhibición de gel experimental

