

UNIVERSIDAD PRIVADA SAN JUAN BAUTISTA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



**EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE *BIXA ORELLANA* EN
COMPARACIÓN A *CAMELLIA SINENSIS* FRENTE AL *STREPTOCOCCUS*
MUTANS (ATCC 25175)**

TESIS

PRESENTADO POR BACHILLER

GRANADOS JAMANCA LINDSAY STEFFANY

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA**

LIMA – PERÚ

2022

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: BIOMATERIALES
SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN: MATERIALES DENTALES

ASESOR:

DR. ESP. CÉSAR FÉLIX CAYO ROJAS

ORCID 0000-0002-5560-7841

TESISTA:

BACH. LINDSAY STEFFANY GRANADOS JAMANCA

ORCID 0000-0002-8804-6841

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi asesor de tesis el Dr. Esp. César Félix Cayo Rojas, quien, con su experiencia, conocimiento y motivación me oriento en la investigación. Quien forma parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan y siendo el principal colaborador durante todo este proceso.

DEDICATORIA

A Dios quien ha sido mi guía, fortaleza y amor, ha estado conmigo hasta el día de hoy, permitiéndome vivir una muy grata experiencia en mi etapa universitaria.

A mis padres Edita y Martín quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades.

A mi hermana Greyssi, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.

RESUMEN

Objetivo: El objetivo del estudio fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Bixa orellana* en comparación con el extracto etanólico de *Camellia sinensis*, frente a *Streptococcus mutans* a las 24, 48 y 72 horas.

Métodos: Este estudio experimental *in vitro* y longitudinal tuvo una muestra de 12 pocillos por grupo. Para evaluar la actividad antibacteriana de todas las concentraciones (100%, 75% y 50%) por el método de difusión en pocillo en Agar Müller Hinton, se hizo en dos etapas, en la primera se determinó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Camellia sinensis* y extracto metanólico de *Bixa orellana*. En la segunda etapa se comparó las concentraciones con mayor actividad antibacteriana de ambos extractos tomando como control la clorhexidina al 0.12%. Además, se evaluó la sensibilidad antibacteriana según la escala de Duraffourd y se determinó la concentración mínima inhibitoria y bactericida (CMI y CMB). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis y la prueba de ANOVA de un factor intergrupos e intragrupos, con post hoc de Tukey y Bonferroni, considerando un nivel de significancia del 5%.

Resultados: En la primera etapa, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* (100% y 75%) y el extracto metanólico de *Bixa orellana* (100% y 75%), mostraron mayor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* a las 48 horas ($p < 0.001$ y $p < 0.05$, respectivamente). En la segunda etapa del estudio, a las 48 horas, se observó actividad sumamente sensible frente a *Camellia sinensis* (100% y 75%) y *Bixa orellana* al 100%, además la *Camellia sinensis* al 100% y 75% presentaron significativamente mayor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans*, en comparación con *Bixa orellana* ($p < 0.05$) y la clorhexidina ($p < 0.05$). Además, se pudo observar un aumento significativo de la actividad antibacteriana en todas las concentraciones a las 48 horas ($p < 0.001$), y a su vez disminuyó significativamente la actividad antibacteriana de todos los grupos a las 72 horas ($p < 0.001$). La CMI del extracto etanólico de *Camellia sinensis* fue 250 mg/ml y su CMB fue 500 mg/ml. Mientras que en el extracto metanólico de *Bixa orellana* su CMI fue 125 mg/ml y su CMB fue 500 mg/ml.

Conclusion: A una concentración del 100%, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y el extracto metanólico de *Bixa orellana*, presentaron su mayor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* a las 48 horas; siendo el extracto de *Camellia sinensis* más efectivo en comparación al extracto de *Bixa orellana*. Sin embargo, este efecto antibacteriano disminuyó en ambos extractos a las 72 horas.

Palabras clave: *Bixa orellana*, *Camellia sinensis*, Chlorhexidine, Inhibition halos, Microbial Sensitivity Test, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum bactericidal concentration, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Background: The objective of the study was to evaluate the antibacterial activity of the methanolic extract of *Bixa orellana* compared to the ethanolic extract of *Camellia sinensis*, against *Streptococcus mutans* at 24, 48 and 72 hours.

Methods: This experimental in vitro and longitudinal study had a sample of 12 wells per group. To evaluate the antibacterial activity of all concentrations (100%, 75% and 50%) by the well diffusion method in Müller Hinton Agar, it was done in two stages, in the first the antibacterial activity of the ethanolic extract of *Camellia sinensis* and methanolic extract of *Bixa orellana*. In the second stage, the concentrations with the highest antibacterial activity of both extracts were compared, taking 0.12% chlorhexidine as a control. In addition, the antibacterial sensitivity was evaluated according to the Duraffourd scale and the minimum inhibitory and bactericidal concentration (MIC and CMB) were determined. Statistical analysis was performed using the Kruskal Wallis test and the intergroup and intragroup ANOVA test of one factor, with Tukey and Bonferroni post hoc, considering a significance level of 5%.

Results: In the first stage, the ethanolic extract of *Camellia sinensis* (100% and 75%) and the methanolic extract of *Bixa orellana* (100% and 75%) showed greater antibacterial activity against *Streptococcus mutans* at 48 hours ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). In the second stage of the study, at 48 hours, highly sensitive activity was observed against *Camellia sinensis* (100% and 75%) and *Bixa orellana* at 100%, in addition *Camellia sinensis* at 100% and 75% showed significantly greater antibacterial activity. against *Streptococcus mutans*, compared to *Bixa orellana* ($p < 0.05$) and chlorhexidine ($p < 0.05$). In addition, a significant increase in antibacterial activity could be observed in all concentrations at 48 hours ($p < 0.001$), and in turn, the antibacterial activity of all groups decreased significantly at 72 hours ($p < 0.001$). The MIC of the ethanolic extract of *Camellia sinensis* was 250 mg/ml and its MBC was 500 mg/ml. While in the methanolic extract of *Bixa orellana*, its MIC was 125 mg/ml and its CMB was 500 mg/ml.

Conclusion: At a concentration of 100%, the ethanolic extract of *Camellia sinensis* and the methanolic extract of *Bixa orellana*, presented their highest antibacterial activity against *Streptococcus mutans* at 48 hours; being the most effective *Camellia sinensis* extract compared to *Bixa orellana* extract. However, this antibacterial effect diminished in both extracts at 72 hours.

Keywords: *Bixa orellana*, *Camellia sinensis*, Chlorhexidine, Inhibition halos, Microbial Sensitivity Test, Minimum Inhibitory Concentration, Minimum bactericidal concentration, *Streptococcus mutans*.

INDICE

1. INTRODUCCION	3
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
2. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	8
3. HIPÓTESIS	12
3.1. HIPÓTESIS GENERAL.....	12
3.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	12
4. VARIABLES	13
4.1. DEFINICIÓN CONCEPTUAL DE LA (S) VARIABLE (S)	13
4.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (ANEXO 1)	13
5. OBJETIVOS.....	14
5.1. OBJETIVO GENERAL	14
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
6.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	14
6.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	14
6.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN	15
6.2. POBLACIÓN Y MUESTRA	15
6.3. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL.....	15
6.4. CRITERIOS SELECCIÓN DE LA MUESTRA	16
6.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS	16
6.6. PROCEDIMIENTOS Y MEDIOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	16
6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
7. RESULTADOS.....	21
8. DISCUSIÓN	27
9. CONCLUSIONES	34
10. RECOMENDACIONES	34
BIBLIOGRAFIA	35
ANEXO	40

Document Information

Analyzed document	TESIS - LINDSAY STEFFANY GRANADOS JAMANCA (FINAL) 3.docx (D143059853)
Submitted	2022-08-19 03:31:00
Submitted by	César Cayo
Submitter email	cesar.cayo@upsjb.edu.pe
Similarity	4%
Analysis address	cesar.cayo.upsjb@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	Universidad Privada San Juan Bautista / PLAN DE TESIS - LINDSAY STEFFANY GRANADOS JAMANCA.pdf Document PLAN DE TESIS - LINDSAY STEFFANY GRANADOS JAMANCA.pdf (D112260769) Submitted by: cesar.cayo@upsjb.edu.pe Receiver: cesar.cayo.upsjb@analysis.arkund.com	 2
SA	1A_MEDRANO COLMENARES SARA MERCEDES_Título Profesional_2022.docx Document 1A_MEDRANO COLMENARES SARA MERCEDES_Título Profesional_2022.docx (D128485878)	 10
SA	Universidad Privada San Juan Bautista / 1. P.T. HEREDIA CHAVEZ NORBIL.pdf Document 1. P.T. HEREDIA CHAVEZ NORBIL.pdf (D140332090) Submitted by: ELOY.GAMBOA@UPSJB.EDU.PE Receiver: eloy.gamboa.upsjb@analysis.arkund.com	 2
SA	1A_Cayo_Rojas_Cesar_Felix_Doctorado_2018.docx Document 1A_Cayo_Rojas_Cesar_Felix_Doctorado_2018.docx (D44227836)	 3



UNIVERSIDAD PRIVADA SAN JUAN BAUTISTA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ENFERMERIA

INFORME DE VERIFICACIÓN DE SOFTWARE ANTIPLAGIO

FECHA: 19 de Agosto del 2022

NOMBRE DEL AUTOR (A) / ASESOR (A):

Lindsay Steffany Granados Jamanca / César Félix Cayo Rojas
.....

TIPO DE PROINVESTIGACIÓN:

- PROYECTO ()
- TRABAJO DE INVESTIGACIÓN ()
- TESIS (X)
- TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL ()
- ARTICULO ()
- OTROS ()

INFORMO SER PROPIETARIO (A) DE LA INVESTIGACIÓN VERIFICADA POR EL SOFTWARE ANTIPLAGIO URKUND, EL MISMO TIENE EL SIGUIENTE TÍTULO:

EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE *BIXA ORELLANA* EN COMPARACIÓN A *CAMELLIA SINENSIS* FRENTE AL *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC 25175)

CULMINADA LA VERIFICACIÓN SE OBTUVO EL SIGUIENTE PORCENTAJE: 4 %

Conformidad Autor:

Conformidad Asesor:

Nombre: Lindsay Steffany Granados Jamanca

Nombre: César Félix Cayo Rojas

DNI: 71408606

DNI: 41613915

Huella:



1. INTRODUCCION

La caries dental es una enfermedad infecciosa de origen multifactorial, que se da producto de una disbiosis entre las bacterias que habitan la cavidad oral; dando lugar a que predominen los microorganismos más cariogénicos entre los que se encuentran principalmente el *Streptococcus mutans* ⁽¹⁾. Esta bacteria es un coco gram positivo, y su potencial cariogénico se debe principalmente a su capacidad de sintetizar grandes cantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir de la sacarosa, además de la capacidad de transportar y metabolizar carbohidratos en ácidos orgánicos, y finalmente a la capacidad de prosperar en condiciones ambientales de bajo pH ^(2,3).

La caries dental tiene un gran porcentaje de prevalencia en América latina y el Caribe, afectando la dentición temporal y permanente, causando la desmineralización del esmalte y la dentina hasta destruir el órgano dental ⁽⁴⁾. Muchas personas alrededor del mundo ven afectadas su salud física y emocional a causa de esta enfermedad que puede generar desde dolor agudo, hasta la pérdida definitiva de la pieza dental ⁽⁵⁾. La higiene minuciosa, una dieta equilibrada y baja en azúcares, así como las visitas periódicas al dentista, pueden ayudar a prevenir y minimizar la prevalencia de esta enfermedad, ya que cada vez son más los procedimientos para prevenir la caries dental, tales como la aplicación de flúor barniz, el fluoruro diamino de plata, la aplicación de sellantes, entre otros ⁽⁶⁾.

Si bien es cierto que la población tiene a su alcance diferentes tipos de tratamientos para combatir ciertas enfermedades, cada vez son más las personas que confían en las propiedades fitoterapéuticas de las diversas

especies vegetales que existen en su entorno geográfico. En los países en desarrollo, como en América del Sur, donde predomina la desigualdad económica, cultural y social, existen comunidades nativas, campesinos y pobladores que utilizan los recursos naturales como medicina tradicional para combatir diversas enfermedades, principalmente infecciones. Ante la ausencia de personal médico, la población pone su salud en manos de curanderos, quienes han aprendido de manera empírica a combatir enfermedades de forma natural, ya que se han vuelto expertos en el uso de la medicina tradicional ^(7,8).

Es de conocimiento que muchos fármacos se han elaborado a partir de principios activos extraídos de las plantas; razón por la cual, el estudio de la medicina alternativa y complementaria se viene desarrollando de forma superlativa ⁽⁹⁾. Además, se ha reportado que la resistencia antibiótica de algunos microorganismos patógenos se puede prevenir mediante el uso de nuevos compuestos que no sean a base de los mismos agentes antimicrobianos sintéticos que ya existen, sino más bien utilizar distintas especies vegetales que aporten una nueva fuente antibiótica ^(10,11).

En gran parte de América del sur, por ejemplo en Perú, existen una gran diversidad de especies vegetales a los que la población le viene sacando el máximo beneficio medicinal, como es el caso de la *Bixa Orellana* (*B. orellana*), que posee actividad antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, anticonvulsiva y cardioprotectora ⁽¹²⁾; además se sabe que el extracto etanólico de sus hojas posee actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram positivos y a hongos como la *Candida albicans* (*C. albicans*) ^(13,14). Medina *et al*, reportó el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *B. Orellana* utilizando el metanol

para extraer fenoles y flavonoides propios de la planta ⁽¹⁵⁾. Además, Alim *et al*, reportó que los alcaloides, fenoles, triterpenoides, glucósidos y taninos de la *B. orellana* presentaron buen potencial antimicrobiano para inhibir microorganismos orales ⁽¹⁶⁾.

Otra especie vegetal que ha cobrado importancia en el ámbito farmacológico por sus propiedades vinculadas a una menor incidencia de cáncer oral, caries dental, accidente cerebrovascular, enfermedades cardiovasculares y obesidad, es el *Camellia sinensis* (*C. sinensis*) ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Sus propiedades se deberían a las altas concentraciones en polifenoles tales como la epicatequina, epicatequina galato y epigallocatequina ⁽²⁰⁾, las cuales inhibirían el crecimiento bacteriano de la *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Salmonella typhi* y *Shigella* ⁽²¹⁾. Estos compuestos polifenólicos disminuyen también la producción de ácidos por parte de los *Streptococcus* y su capacidad para sintetizar glucano adherente ^(22,23). Un estudio reportó que el conjunto de compuestos polifenoles de la *C. sinensis*, llamado Sunphenon, tiene efectos sobre el *S. mutans* causando disminución de la viabilidad celular, reducción de la unión celular del microorganismo a la superficie de hidroxiapatita y que una dieta suplementada con Sunphenon contribuiría a tener menos lesiones cariosas ⁽²⁴⁾. De esta manera se puso en evidencia que los polifenoles del *C. sinensis* podrían usarse como una fuente de liberación lenta de catequinas activas contra el crecimiento de *Streptococcus*, y además pueden inhibir la adherencia preliminar de *S. mutans* a la superficie dental ⁽¹⁷⁾.

Debido a estas bases científicas, resulta importante evaluar la actividad antimicrobiana de la *B. orellana* y *C. sinensis* frente al *S. mutans* y de esta

manera descubrir que producto natural presenta mayor eficacia frente a este patógeno oral, para poder brindar una alternativa en el área clínica odontológica para la prevención y tratamiento de la caries dental, sentando las bases para futuros ensayos clínicos aleatorizados como colutorios o pastas dentales a base de estos productos naturales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *B. orellana* en comparación con el extracto etanólico de *C. sinensis*, frente a *S. mutans* a las 24, 48 y 72 horas. La hipótesis nula considerada en este estudio fue que no existen diferencias significativas al comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *C. sinensis* y el extracto metanólico de *B. orellana* frente al *S. mutans* a distintos tiempos.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cavidad oral posee una gran diversidad de microorganismos, entre los que se encuentra el *Streptococcus mutans* que es el principal agente causal de la caries dental, ésta es una enfermedad con alta prevalencia a nivel mundial la cual tiene una causa multifactorial.¹ El estudio de las plantas como medicina alternativa y complementaria en diversos tratamientos viene ampliando el conocimiento científico sobre el uso que se le puede dar a estas como es el caso de la *Bixa Orellana* o Achiote y el *Camellia sinensis* o té verde ambas son productos naturales muy conocidos en el Perú y gran parte de América del Sur por ello se ha realizado números estudios empleándolos como agentes antibacterianos aplicados en el campo de la odontología⁽²⁻³⁾. Murillo en el 2019, evaluó el uso del

Achiote (*Bixa Orellana*) a diferentes concentraciones y evidenció que presentaba un componente químico carotenoide antibacteriano, a saber el 9'-cis-norbixina y todo-trans-norbixina, que afectaba el crecimiento y desarrollo de *Streptococcus mutans*.⁵¹ Por otro lado Ferreyra en el 2017, analizó los componentes químicos de la hoja de Té verde (*Camellia Sinensis*) y encontró la epigallocatequina-3-galato (EGCG), siendo éste es el principal compuesto responsable de su acción antibacteriana.⁵⁴ Lo que propone esta investigación es dar a conocer las propiedades antibacterianas que poseen estos productos naturales frente al *Streptococcus mutans* y poder utilizarlas en el campo de la odontología para prevenir la caries dental y sentar las bases para futuros trabajos a manera de ensayos clínicos controlados. Por ello, el objetivo de este estudio será evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Bixa Orellana* y el extracto etanólico de *Camellia sinensis*, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Formulación del problema

Problema General

¿Qué solución ofrece mayor actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de *Bixa Orellana* y el extracto etanólico de *Camellia sinensis*, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)?

Problemas Específicos

- ¿Cuál es la CMI y CMB que presenta el extracto metanólico de *Bixa Orellana* y el extracto etanólico de *Camellia sinensis*, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)?

- ¿Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), a las 24, 48 y 72 horas?
- ¿Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas?.
- ¿Existen diferencias significativas de la variación de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas?

2.ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

En el 2020, Cayo y Cervantes.⁴¹ evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico del té verde (*Camellia sinensis*) al 10 % y 20 % comparado con extracto etanólico de propóleo al 10 % y 20 %, frente al crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Su estudio fue experimental *in vitro*, longitudinal, prospectivo y comparativo. El universo estuvo constituido por 90 discos de difusión y la muestra por 15 discos embebidos en té verde (*Camellia sinensis*) o propóleo a diferentes concentraciones, clorhexidina acuosa al 0,12 % y agua destilada. El tamaño de muestra se calculó por fórmula de comparación de medias, después de realizar un estudio piloto. Se colocaron los discos de difusión embebidos en las sustancias sobre agar Mueller Hinton, sembrado con *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), haciendo medición del ancho de los

halos inhibitorios a las 24 y 48 h. Se aplicaron pruebas de comparación no paramétricas de Kruskal Wallis y la prueba rangos de Wilcoxon. Como resultado obtuvieron que el máximo ancho de halo inhibitorio logrado por clorhexidina acuosa al 0,12 %, extracto etanólico de té verde (*Camellia sinensis*) al 20 % y extracto etanólico de propóleo al 20 % fue a las 24 h con valores de 10,64 mm \pm 0,924 mm, 6,82 mm \pm 0,982 mm y 8,36 mm \pm 1,286 mm, respectivamente. El extracto etanólico de té verde (*Camellia sinensis*) al 20 %, presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al extracto etanólico de propóleo al 20 %, tanto a las 24 h ($p= 0,013$), como a las 48 h ($p= 0,011$). En conclusión, respecto al crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), el extracto etanólico de propóleo al 20 % presentó mayor actividad antibacteriana respecto al extracto etanólico de té verde (*Camellia sinensis*) al 10 % y 20 %, actividad que disminuye con el paso del tiempo.

En el 2019, Murillo.⁵¹ el objetivo de su estudio fue conocer el efecto inhibitorio del extracto de *Bixa orellana* a distintas concentraciones sobre el *Streptococcus mutans* in vitro. Fue una investigación de experimental y comparativa. Se formaron los grupos A y B a los cuales se les colocó el extracto inhibitorio a una concentración de 50 y 100% respectivamente, se usó clorhexidina al 0.12% como control (+) y agua destilada como control (-), se usó la prueba de Kruskal-Wallis y el test Mann-Whitney. A una concentración de 50% el efecto inhibitorio del halo sobre cepas de *Streptococcus mutans* fue de 6 y 6,25 mm y al 100% un halo de 9,4 mm; la clorhexidina al 0.12% presentando la clorhexidina un registro de 12,50 mm y con respecto al suero fisiológico el extracto de achiote presenta un efecto inhibitorio similar con la concentración del 50% (6 mm) y superior al

100% (8,40 mm). El extracto de *Bixa orellana* no fue superior al efecto de la clorhexidina al 0,12% frente al *Streptococcus mutans*.

En el 2019, Collantes.⁵² comparó el efecto antibacteriano *in vitro* entre tres concentraciones de extracto hidroetanólico de hoja de *Bixa orellana* L. frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La población estuvo conformada por cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, los cuales fueron incubados en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya. Además, se recolectó e identificó la planta de achiote de la cual se elaboraron extractos de las hojas en diferentes concentraciones, 25, 50 y 75%. El efecto antibacteriano se evaluó mediante el método de Kirby Bauer. El extracto al 25% obtuvo una media 19.43mm, al 50% una media 23.35 mm, y al 75% una media 26.38mm. Se aplicó la prueba ANOVA, encontrando ($P= 0.00$) que existe diferencia estadística significativa entre los tres tipos de concentraciones. En conclusión, el extracto hidroetanólico de las hojas de *Bixa orellana* L. al 75% presentó mayor efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* que las otras dos concentraciones.

En el 2016, Medina.¹⁵ evaluó el efecto citotóxico y antibacteriano del extracto de metanol de *Bixa orellana* (*B. orellana*) contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Se prepararon 2 extractos de metanol de *B. orellana* *in vitro*, a partir de las semillas y las hojas. La actividad antibacteriana de los extractos contra *S. mutans* y *S. sanguinis* se evaluó utilizando el agar de placa de copa. La MIC se determinó usando el método de micro-dilución y la actividad citotóxica se determinó usando la línea celular MDCK. Se visualizó un efecto antibacteriano muy fuerte con el extracto metanólico de hojas con una zona de inhibición de 19.97 mm contra *S. mutans* y 19.97 mm contra *S. sanguinis*. El extracto metanólico de las semillas tuvo una actividad de 15.11 mm y 16.15 mm

contra *S. mutans* y *S. sanguinis*, respectivamente. El MIC de la hoja y los extractos de semillas contra *S. sanguinis* fue de 62,5 y 125 mg / ml, respectivamente, y el MIC del extracto de hojas contra *S. mutans* fue de 62,5 mg / ml, y para el extracto de semillas fue de 31,25 mg / mL. La concentración citotóxica al 50% fue de 366.45 y 325.05 mg / ml para los extractos de hojas y semillas, respectivamente. Los hallazgos experimentales demostraron el efecto antibacteriano del extracto metanólico de *B. orellana* (achiote) en *S. mutans*.

En el 2015, Pumacajia;⁵³ realizó un estudio experimental, prospectivo y longitudinal para analizar el efecto antimicrobiano de la infusión de *Camellia sinensis* (té verde) al 20% frente al *Streptococcus mutans* en uso cepillos de dientes por estudiantes del Instituto de Educación Secundaria (IES) San Antonio Padua, también en comparación con un enjuague bucal común (clorhexidina al 0.12%) y agua para consumo humano. La muestra consistió en 36 cepillos de dientes. La técnica fue el instrumento de observación y una forma de recopilación de datos. En una primera fase, se le dio a cada estudiante un nuevo cepillo de dientes y pasta de dientes, se monitoreó el cepillado dental por 5 días, luego se recolectó cada cepillo en un recipiente estéril para ser transportarlo al laboratorio de microbiología. Para el muestreo de cepillos de cabeza sumergidos en tubos de ensayo no contaminados que contenían 5 ml de medio de transporte (tioglicolato), fue cultivado en agar Mitis salivarius. En una segunda fase, se cepillaron los cepillos de dientes nuevos durante cinco días después de cada cepillado de infusión *Camellia sinensis*. Se aplicó un 20% de pulverización; 03 fueron escobillas seleccionadas al azar para poner clorhexidina al 0,12% y 03 escobillas para rociar agua potable. Se realizó el procesamiento de la muestra como en la primera etapa. UFC cuenta después de poner la infusión, clorhexidina

y agua; y comparado con el número de UFC antes de aplicar las soluciones estudiadas. En la intervención previa se observó una amplia variación en el grado de contaminación de los cepillos de *Streptococcus mutans* con un promedio de 42,3 UFC / ml. En la fase posterior a la intervención, la infusión de *Camellia sinensis* mostró un efecto antibacteriano frente al *Streptococcus mutans* con un reducción promedio de 74.5% en UFC, la clorhexidina 0.12% tuvo una reducción promedio de 92.4% en UFC, y el agua potable mostró el menor efecto antibacteriano con una reducción promedio de 12.2% en CFU. Se concluyó que el efecto antibacteriano de la infusión de *Camellia sinensis* al 20% es similar al efecto antibacteriano de la clorhexidina al 0.12% y que produjo una disminución significativa de UFC de *Streptococcus mutans* como la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

3. HIPÓTESIS

3.1. HIPÓTESIS GENERAL

- El extracto metanólico de *Bixa Orellana* presentaría diferencias significativas en comparación al extracto etanólico de *Camellia sinensis*, respecto a la actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

3.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), a las 24, 48 y 72 horas.

- Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas.
- Existen diferencias significativas de la variación de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas.

4. VARIABLES

4.1. DEFINICIÓN CONCEPTUAL DE LA (S) VARIABLE (S)

Variable independiente:

- Extracto metanólico de la hoja de *Bixa orellana*.
- Extracto etanólico de la hoja de *Camellia sinensis*.

Variable dependiente:

- Actividad antibacteriana

4.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES (ANEXO 1)

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Bixa Orellana* y el extracto etanólico de *Camellia sinensis*, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la CMI y CMB que presenta el extracto metanólico de *Bixa Orellana* y el extracto etanólico de *Camellia sinensis*, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).
- Comparar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), a las 24, 48 y 72 horas.
- Comparar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas.
- Comparar la variación de la actividad antibacteriana entre el extracto metanólico de *Bixa Orellana*, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la solución control, frente al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas.

6. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

6.1. DISEÑO METODOLÓGICO

Experimental *in vitro*

6.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

- Prospectivo: porque los datos se recolectaron posterior al experimento.
- Analítico: porque se realizó un análisis bivariado a partir de los datos.

- Longitudinal: Porque los resultados se recabaron en tres momentos diferentes.
- Comparativo: porque se compararon los resultados obtenidos a partir de 2 aplicaciones de productos naturales como antibacteriano.

6.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

- Explicativo: porque se identificó una relación de causa efecto.

6.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población estuvo conformada por 112 discos de difusión.

- Unidad de análisis

Réplica de *Streptococcus mutans*.

6.3. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

El tamaño de muestra estuvo constituido por 12 réplicas ($n = 12$) y se calculó a partir de un estudio piloto por la fórmula de comparación de medias, considerando un $\alpha = 0.05$ y un poder estadístico de $1 - \beta = 0.80$ con varianzas $S_1^2 = 0.56$ y $S_2^2 = 0.81$ y una diferencia de medias de 1.2 mm. Además, las unidades de estudio se seleccionaron por muestreo aleatorio simple sin reposición. Los grupos se conformaron de la siguiente manera:

- 12 réplicas con extracto metanólico de hojas de *Bixa orellana* (stock: 1000 mg/ml),
- 12 réplicas con extracto metanólico de hojas de *Bixa orellana* (stock: 750 mg/ml),
- 12 réplicas con extracto metanólico de hojas de *Bixa orellana* (stock: 500 mg/ml),
- 12 réplicas con extracto etanólico de hojas de *Camellia sinensis* (stock: 1000 mg/ml),

- 12 réplicas con extracto etanólico de hojas de *Camellia sinensis* (stock: 750 mg/ml),
- 12 réplicas con extracto etanólico de hojas de *Camellia sinensis* (stock: 500 mg/ml),
- 12 réplicas con Clorhexidina 0.12 % [Control (+)].
- 12 réplicas con agua destilada [Control (-)].

6.4. CRITERIOS SELECCIÓN DE LA MUESTRA

La selección y distribución de los discos de difusión se hizo por el método aleatorio simple sin reposición.

6.5. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación experimental *in vitro*, longitudinal y analítico fue aprobada por un Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Privada San Juan Bautista (UPSJB) en Perú, con resolución No. 1200-2021-CIEI-UPSJB, llevándose a cabo la parte experimental en el laboratorio de Microbiología de la Escuela de Estomatología UPSJB entre febrero y marzo del 2022.

6.6. PROCEDIMIENTOS Y MEDIOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

Recolección y Elaboración de los Extractos

En esta investigación experimental, todos los métodos se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices pertinentes establecidas en la Declaración de política de la IUCN sobre investigaciones relacionadas con especies en riesgo de extinción y la Convención sobre el comercio de especies amenazadas de fauna y flora silvestres.

Se realizó la colecta de la planta con hojas de *Bixa orellana* (1 kg) y planta con hojas de *Camellia sinensis* (1 kg) y su reconocimiento taxonómico de ambas

plantas fue en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (No. 17-USM-2021 y No. 18-USM-2021, respectivamente). Posteriormente, se seleccionaron las hojas de ambas plantas y se procedió a secarlas en una estufa por 24 horas a 60°C; tras lo cual ambas muestras fueron molidas y se colocaron en sendos envases de vidrio ámbar herméticos de 4 litros de capacidad, seguidamente se agregó 1 litro de alcohol etílico al 96% a la muestra preparada de *Camellia sinensis* y 1 litro de metanol absoluto (1:2, p/v) a la de *Bixa orellana* hasta cubrir completamente el producto. Ambos frascos se agitaron 3 veces por cada 24 horas, siendo el tiempo de maceración alcohólica al frío de 7 días. Después de evaporar ambos solventes, se obtuvo los extractos a concentraciones de 1000 mg/ml para cada una de las muestras. Seguidamente, para evaluar la CMI y la CMB del extracto metanólico de *Bixa orellana* y del extracto etanólico de *Camellia sinensis*, se realizaron diluciones seriadas de factor 2, desde 1:2 hasta 1:128.

Procedimiento para evaluar sensibilidad antibacteriana

La cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) fue reactivada en Agar TSA contenido en placas Petri de 94 x 16 mm, en anaerobiosis controlada, a 37°C y durante 72 horas según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se procedió a aislar una azada de colonias bacterianas, y usadas para la estandarización del ensayo mediante la preparación de un inóculo a 0.5 en la escala de McFarland. La suspensión bacteriana fue sembrada de manera homogénea en todas las placas Petri conteniendo Agar Mueller Hinton elaboradas previamente y a las cuales con la ayuda de un sacabocados se le realizaron 05 perforaciones de 6 mm de diámetro para evaluar la sensibilidad antibacteriana de los extractos mediante la técnica de los pocillos. A cada pocillo

se agregó 100 µl de extracto metanólico de *Bixa orellana* o extracto etanólico de *Camellia sinensis* a las concentraciones de 1000 mg/ml, 750 mg/ml y 500 mg/ml, Clorhexidina al 0.12% como control positivo y agua destilada como control negativo, acorde a grupos de estudio experimentales establecidos. Todo el procedimiento fue realizado bajo una campana de bioseguridad tipo II para evitar contaminación ambiental y cruzada. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis controlada a 37°C durante 24 h, 48 h y 72 horas. Transcurrido cada uno de los tiempos de incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición en milímetros (mm) con la ayuda de un vernier digital calibrado (Vogel, Alemania) y se anotó en hoja de cálculo de Microsoft® Excel 2019.

Para disminuir al máximo el sesgo de medición se utilizó la técnica de doble ciego, porque tanto el que midió los halos de inhibición como el que hizo el análisis estadístico, desconocían la asignación de los grupos de acuerdo al producto empleado. Por otro lado, se hizo una calibración de medición de los halos inhibitorios del investigador principal, tanto intraexaminador (LG), como interexaminador (LG y EG) y se obtuvo un coeficiente de correlación R de Pearson de 0.91 (IC: 0.84 – 0.98) y 0.84 (IC: 0.79 – 0.89) respectivamente, demostrando muy buena concordancia.

Finalmente, se utilizó la escala de Duraffourd ^(25,26) para evaluar la sensibilidad antibacteriana de ambos extractos en sus diferentes concentraciones, según sus halos de inhibición y se comparó con la clorhexidina al 0.12% (control). **[Tabla 1].**

Tabla 1. Escala de Duraffourd para determinar sensibilidad antifúngica, de acuerdo al diámetro de los halos de inhibición.

Escala de Duraffourd		
Clasificación	Representación	Diámetro (mm)
Nula	-	< 8
Sensible	+	8 – 13.99
Muy sensible	++	14 – 20
Sumamente sensible	+++	> 20

mm: milímetros

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Se utilizaron cepas reactivadas de *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175) cultivadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Privada San Juan Bautista, Perú.

La CMB se consideró como la mínima concentración de un antibiótico que, en un período de tiempo predeterminado, fue capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99.9% de una población bacteriana; mientras que la CMI fue la concentración mínima del extracto donde no hubo crecimiento visible después del periodo de incubación ⁽²⁷⁾.

Se prepararon placas de agar *BHI* (*Brain Heart Infusion*) con 48 horas de anticipación. En tubos microcentrífuga de 1.5 ml estériles, se agregó 100 ul del extracto por cada dilución. Se midió la absorbancia mediante un espectrofotómetro DR 6000 UV-VIS® con un haz luminoso a una distancia de 1 cm. La absorbancia a 600 nm dio un valor entre 0.08 y 0.10, luego se procedió con la preparación de la suspensión del inóculo de tal manera que se ajustara a 1.5×10^8 UFC/mL, de acuerdo con la turbidez estándar de 0.5 de McFarland bd bbl®.

A cada tubo microcentrífuga se le agregó un volumen de 5 ul de *S. mutans*, se homogenizó mediante vórtice (Thermolyne®) y se midió la absorbancia de la turbidez de la solución stock y sus diluciones con el espectrofotómetro. Acto seguido, los tubos fueron incubados a 37°C por 24 horas en condiciones anaeróbicas, pasado este tiempo se volvió a medir la absorbancia y se comparó con el primer resultado para determinar el CMI. Posteriormente, 100 ul del extracto fue inoculado y diseminado en las placas de agar *BHI (Brain Heart Infusion)* mediante asas estériles. Las placas fueron incubadas a 37°C por 24 horas en condiciones anaeróbicas y se realizó la inspección visual para evidenciar crecimiento de colonias. De acuerdo a estos resultados se determinó CMB⁽²⁷⁾.

6.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fueron recolectados en una ficha ad hoc e ingresados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2019®, posteriormente fueron exportados y procesado con el paquete estadístico SPSS® versión 24. Para el análisis descriptivo se utilizó medidas de tendencia central y dispersión, como la media y la desviación estándar. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de homocedasticidad de Levene, cuyos resultados demostraron que los datos reunían los requisitos para aplicar el test de ANOVA de un factor intergrupos con el post hoc de Tukey en el caso del extracto de *Camelia sinensis*. Sin embargo, esto no se cumplió en el caso del extracto de *Bixa orellana*, por ello se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con el post hoc de Bonferroni. Además, para comparar las medidas relacionadas tanto para el extracto de *Camellia*

sinensis como para el extracto de *Bixa orellana* se evaluó la distribución normal y esfericidad (Test de Shapiro Wilk y Test W de Mauchly, respectivamente) de las diferencias de medias entre tiempos. Al verificar el cumplimiento de los supuestos estadísticos se utilizó el test de ANOVA de un factor intragrupos con la corrección post hoc de Bonferroni. En todas las pruebas estadísticas se consideró un nivel de significancia al 95 % ($p < 0.05$).

7. RESULTADOS

A las 24 y 72 horas, las cepas de *Streptococcus mutans* presentaron sensibilidad frente al extracto etanólico de *Camellia sinensis* al 100%, 75% y 50%. Sin embargo, a las 48 horas, se observó actividad sumamente sensible frente a las tres concentraciones de *Camellia sinensis*. **[Tabla 2].**

El extracto etanólico de *Camellia sinensis* al 100% y 75% presentaron los mayores promedios de halos inhibitorios a las 24 horas con 9.53 mm (IC 95%: 9.16 – 9.89) y 9.73 mm (IC 95%: 9.23 – 10.22) respectivamente. De la misma forma a las 48 horas con 24.58 mm (IC 95%: 23.75 – 25.42) y 23.52 mm (IC 95%: 22.89 – 24.14) respectivamente. Asimismo, a las 72 horas con 13.90 mm (IC 95%: 13.55 – 14.25) y 11.99 mm (IC 95%: 11.30 – 12.68) respectivamente. **[Tabla 2].**

Por otro lado, a las 24 horas, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* al 100% y 75% presentaron significativamente mayor actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*, en comparación a la clorhexidina 0.12% ($p = 0.002$ y $p < 0.001$, respectivamente). Además, este efecto aumentó a las 48 horas ($p < 0.001$ y $p < 0.001$, respectivamente). Sin embargo, a las 72 horas solo el

extracto etanólico de *Camellia sinensis* al 100% mostró significativamente mayor actividad antibacteriana que la clorhexidina al 0.12% ($p = 0.010$). [Tabla 2 y Figura 1].

Tabla 2. Valores descriptivos y comparación de halos inhibitorios (mm), según la actividad antibacteriana de tres concentraciones del extracto etanólico de *C. sinensis*, según el tiempo.

Tiempo	Solución	n	Media	DE	EE	IC95%		Mín	Máx	F	p	S*
						LI	LS					
24 h	CS 100%	12	9.53 ^{a,b}	0.57	0.16	9.16	9.89	8.40	10.30	8.82	<0.001	+
	CS 75%	12	9.73 ^a	0.78	0.22	9.23	10.22	8.50	11.20			+
	CS 50%	12	8.99 ^{b,c}	0.58	0.17	8.62	9.36	8.10	9.90			+
	CHX 0.12%	12	8.56 ^c	0.50	0.14	8.24	8.88	7.80	9.30			+
48 h	CS 100%	12	24.58 ^d	1.32	0.38	23.75	25.42	22.50	26.70	119.97	<0.001	+++
	CS 75%	12	23.52 ^d	0.99	0.28	22.89	24.14	22.10	25.20			+++
	CS 50%	12	20.11 ^e	0.85	0.25	19.57	20.65	18.50	21.70			+++
	CHX 0.12%	12	16.88 ^f	1.21	0.35	16.12	17.65	15.20	18.70			++
72 h	CS 100%	12	13.90 ^g	0.55	0.16	13.55	14.25	12.90	14.80	35.74	<0.001	+
	CS 75%	12	11.99 ^h	1.08	0.31	11.30	12.68	10.90	14.20			+
	CS 50%	12	10.88 ⁱ	0.66	0.19	10.46	11.29	10.20	12.20			+
	CHX 0.12%	12	12.89 ^k	0.56	0.16	12.53	13.25	12.20	13.90			+

n: réplicas (tamaño de muestra); DE: Desviación Estándar; EE: Error Estándar de la media; 95% IC: Intervalo de confianza al 95%; LI: Límite Inferior; LS: Límite Superior; F: Basado en la prueba de ANOVA de un factor intergrupos ($p < 0.05$, diferencias significativas). *Basado en la escala de Duraffourd: sensible (+), muy sensible (++) y sumamente sensible (+++), CS: *Camellia sinensis*; CHX: clorhexidina al 0.12%. Letras diferentes son significancias diferentes, según Post hoc de Tukey.

A las 24 horas, las cepas de *Streptococcus mutans* presentaron sensibilidad frente al extracto metanólico de *Bixa orellana* al 100%, 75% y 50%. Sin embargo, a las 48 horas se observó actividad sumamente sensible frente a este extracto al 100% y 75%. [Tabla 3].

El extracto metanólico de *Bixa orellana* al 100% y 75% presentaron los mayores promedios de halos inhibitorios a las 24 horas con 10.22 ± 1.33 mm y 9.05 ± 0.43 mm, respectivamente. De la misma forma a las 48 horas con 22.70 ± 3.68 mm y 21.50 ± 3.71 mm, respectivamente. Asimismo, a las 72 horas con 17.22 ± 2.46 mm y 16.28 ± 2.15 mm, respectivamente. **[Tabla 3].**

Por otro lado, a las 24 horas, solo el extracto metanólico de *Bixa orellana* al 100% mostró significativamente mayor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans*, en comparación al mismo extracto al 50% ($p = 0.001$). Sin embargo, a las 48 y 72 horas, el extracto metanólico de *Bixa orellana* al 100% y 75% presentaron significativamente mayor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* ($p < 0.05$), en comparación a la clorhexidina 0.12%. **[Tabla 3].**

Tabla 3. Valores descriptivos y comparación de halos inhibitorios (mm), según la actividad antibacteriana de tres concentraciones del extracto metanólico de *B. orellana*, según el tiempo.

Tiempo	Solución	n	Media	DE	Mediana	RIC	Mín	Máx	KW	P	S*
24 h	BO 100%	12	10.22	1.33	10.10 ^a	1.92	7.60	12.10	14.664	0.002	+
	BO 75%	12	9.05	0.43	8.90 ^{a,b}	0.62	8.60	9.90			+
	BO 50%	12	8.51	0.71	8.35 ^b	1.35	7.70	9.60			+
	CHX 0.12%	12	9.32	0.94	9.50 ^{a,b}	1.00	7.50	10.90			+
48 h	BO 100%	12	22.70	3.68	23.35 ^a	5.22	16.70	28.30	22.847	0.000	+++
	BO 75%	12	21.50	3.71	20.70 ^a	6.30	16.30	28.80			+++
	BO 50%	12	19.19	1.66	19.30 ^{a,b}	2.37	16.50	21.70			++
	CHX 0.12%	12	16.48	1.44	16.10 ^b	2.40	14.40	18.40			++
72 h	BO 100%	12	17.22	2.46	16.05 ^a	3.75	15.10	22.60	21.795	0.000	++
	BO 75%	12	16.28	2.15	16.15 ^a	3.48	13.10	20.10			++
	BO 50%	12	12.09	4.10	13.35 ^{b,c}	7.72	6.00	16.90			+
	CHX 0.12%	12	13.03	1.45	12.95 ^c	1.70	10.70	15.20			+

n: réplicas (tamaño de muestra); RIC: Rango Intercuartilar; KW: Basado en la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.05$, diferencias significativas). *Basado en la escala de Duraffourd: sensible (+), muy sensible (+ +) y sumamente sensible (+ + +), BO: *Bixa orellana*; CXH: clorhexidina al 0.12% (control). Letras diferentes significancias son diferentes según Post hoc de Dunnet con corrección de Bonferroni.

A evaluar dos concentraciones de extracto etanólico de *Camellia sinensis* (100% y 75%) y extracto metanólico de *Bixa orellana* (100% y 75%), ya que estas mostraron mayor actividad antibacteriana en la primera etapa frente al *Streptococcus mutans*, se pudo observar a las 24 horas que la sensibilidad fue leve. Sin embargo, a las 48 horas, se observó actividad sumamente sensible frente al extracto etanólico de *Camellia sinensis* (100% y 75%) y extracto metanólico de *Bixa orellana* al 100%. Finalmente, a las 72 horas, el extracto de *Camellia sinensis* (100% y 75%) y *Bixa orellana* (100% y 75%), presentaron actividad muy sensible **[Tabla 4]**.

El extracto etanólico de *Camellia sinensis* al 100% presentó el mayor promedio de halos inhibitorios a las 24 horas con 10.89 ± 0.91 mm. De la misma forma a las 48 horas con 22.25 ± 0.63 mm. Asimismo, a las 72 horas con 17.12 ± 0.66 mm. **[Tabla 4]**.

Por otro lado, a las 24 horas, no hubo diferencias significativas entre la clorhexidina 0.12% (control), el extracto etanólico de *Camellia sinensis* (100% y 75%), y el extracto metanólico de *Bixa orellana* (100% y 75%) frente al *Streptococcus mutans* ($p > 0.05$). Además, a las 48 horas, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* al 100% y 75% presentaron significativamente mayor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans*, en comparación con el extracto metanólico de *Bixa orellana* ($p < 0.05$) y la clorhexidina 0.12% ($p < 0.05$). Finalmente, a las 72 horas, sólo se observó diferencias significativas entre el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y la clorhexidina 0.12% ($p = 0.002$). **[Tabla 4]**.

Tabla 4. Valores descriptivos y comparación de halos inhibitorios (mm) de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *C. sinensis* al 100% y 75% frente al extracto metanólico de *B. orellana* al 100% y 75%, según el tiempo.

Tiempo	Solución	N	Media	DE	Mediana	RIC	Mín	Máx	KW	P	S*
24 h	CS 100%	12	10.89	0.91	10.90 ^a	1.53	9.80	12.50	9.90	0.042	+
	CS 75%	12	10.02	0.29	9.90 ^b	0.40	9.60	10.50			+
	BO 100%	12	10.22	0.58	10.05 ^c	0.67	9.50	11.40			+
	BO 75%	12	10.03	0.38	9.90 ^d	0.73	9.40	10.60			+
	CHX 0.12%	12	10.26	0.37	10.30 ^e	0.60	9.80	10.90			+
48 h	CS 100%	12	22.25	0.63	22.20 ^a	0.85	21.50	23.40	48.35	<0.001	+++
	CS 75%	12	22.07	0.84	21.95 ^a	1.48	21.10	23.70			+++
	BO 100%	12	20.84	0.81	20.75 ^{a,b}	1.08	19.50	22.70			+++
	BO 75%	12	19.18	0.61	19.15 ^{b,c}	0.85	18.30	20.20			++
	CHX 0.12%	12	18.38	0.83	18.25 ^c	1.18	17.10	19.90			++
72 h	CS 100%	12	17.12	0.66	16.80 ^a	0.80	16.40	18.60	14.39	0.006	++
	CS 75%	12	16.58	1.25	16.80 ^{a,b}	2.20	14.50	18.30			++
	BO 100%	12	16.80	0.62	16.60 ^{a,b}	1.15	16.10	17.80			++
	BO 75%	12	16.54	0.50	16.70 ^{a,b}	0.70	15.50	17.20			++
	CHX 0.12%	12	15.93	0.53	15.90 ^b	0.93	15.10	16.80			++

n: réplicas (tamaño de muestra); RIC: Rango Intercuartilar; KW: Basado en la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0.05$, diferencias significativas). *Basado en la escala de Duraffourd: sensible (+), muy sensible (++) y sumamente sensible (+++), CS: *Camellia sinensis*; BO: *Bixa orellana*; CHX: clorhexidina al 0.12% (control). Letras diferentes son significancias diferentes, según Post hoc de Dunnet con corrección de Bonferroni

Al realizar las comparaciones intragrupo del extracto etanólico de *Camellia sinensis* y *Bixa orellana*, a las 24, 48 y 72 horas, se pudo observar un aumento significativo de la actividad antibacteriana en todas las concentraciones a las 48 horas ($p < 0.001$), y a su vez se pudo observar que disminuyó significativamente la actividad antibacteriana de todos los grupos a las 72 horas ($p < 0.001$). Cabe destacar que el mismo patrón se observó con la clorhexidina 0.12% (control) tanto a las 48 horas ($p < 0.001$) como a las 72 horas ($p < 0.001$). (Tabla 5 y Figura 4).

Tabla 5. Comparación intragrupo de halos inhibitorios (mm) a las 24, 48 y 72 horas, según el tipo de solución.

Solución	Tiempo	Diferencia de medias	EE	IC 95%		Z	W	*p	**p
				LI	LS				
CS 100%	24 h	48 h	-11,358	0.267	-12.111	-10.605	0.457		<0.001
		72 h	-6,225	0.330	-7.156	-5.294	0.882	0.21	<0.001
	48 h	72 h	5,133	0.206	4.552	5.715	0.475		<0.001
CS 75%	24 h	48 h	-12,050	0.310	-12.925	-11.175	0.601		<0.001
		72 h	-6,567	0.389	-7.663	-5.470	0.252	0.39	<0.001
	48 h	72 h	5,483	0.450	4.213	6.753	0.155		<0.001
BO 100%	24 h	48 h	-10,625	0.240	-11.301	-9.949	0.220		<0.001
		72 h	-6,583	0.290	-7.402	-5.764	0.612	0.78	<0.001
	48 h	72 h	4,042	0.271	3.277	4.806	0.888		<0.001
BO 75%	24 h	48 h	-9,158	0.194	-9.705	-8.611	0.155		<0.001
		72 h	-6,517	0.196	-7.070	-5.964	0.371	0.999	<0.001
	48 h	72 h	2,642	0.194	2.096	3.188	0.912		<0.001
CHX 0.12%	24 h	48 h	-8,125	0.274	-8.899	-7.351	0.534		<0.001
		72 h	-5,675	0.186	-6.200	-5.150	0.600	0.084	<0.001
	48 h	72 h	2,450	0.341	1.488	3.412	0.356		<0.001

CS: *Camellia sinensis*, BO: *Bixa orellana*, CHX: clorhexidina; Z: Test de Shapiro Wilk, distribución normal de las diferencias de medias ($p > 0.05$); W: Esfericidad de Mauchly ($p > 0.05$); *Basado en el test de ANOVA de un factor intragrupo ($p < 0.05$, diferencias significativas); **Basado en Post hoc de Bonferroni ($p < 0.05$, diferencias significativas).

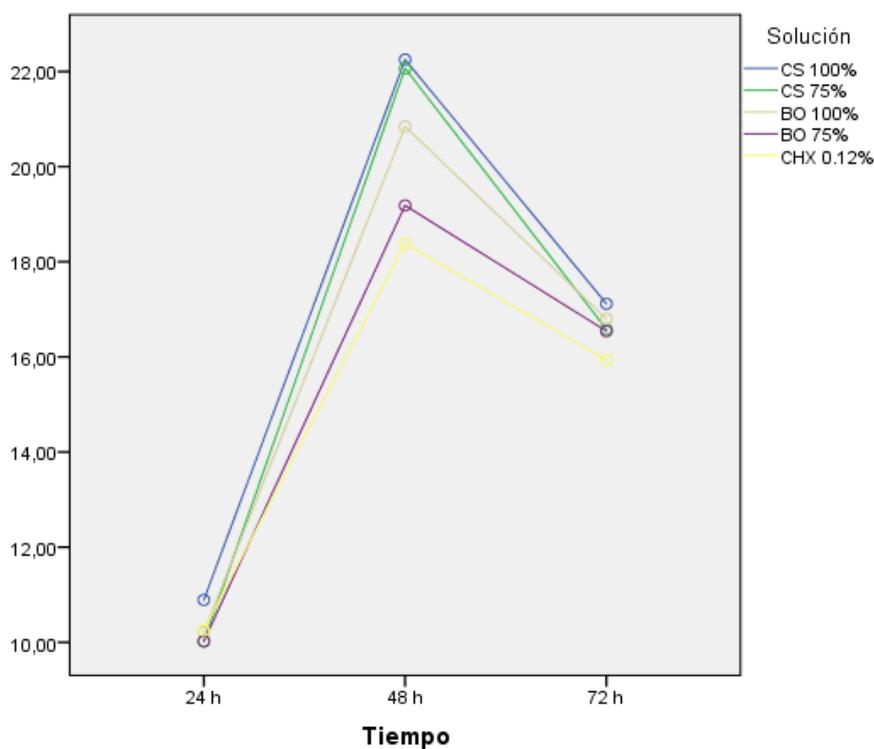


Figura 4. Medias marginales de halos inhibitorios de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Camellia sinensis* (CS) y *Bixa orellana* (BO) frente a clorhexidina 0.12% (CHX), a las 24, 48 y 72 horas.

Respecto al extracto etanólico de la hoja de *Camellia sinensis*, se pudo observar que la CMI frente a la *S. mutans* a las 24 horas fue la segunda dilución (250 mg/ml), según la absorbancia de acuerdo a la turbidez en el tubo. Además, al visualizar el crecimiento de colonias en placa se pudo observar que la CMB fue la primera dilución (500 mg/ml) (**Tabla 6**). Por otra parte, en el extracto metanólico de la hoja de *Bixa orellana*, se pudo observar que la CMI frente al *S. mutans* a las 24 horas fue la tercera dilución (125 mg/ml), de acuerdo a la absorbancia de la turbidez en el tubo. Además, al visualizar el crecimiento de colonias en placa se pudo observar que la CMB fue la primera dilución (500 mg/ml). (**Tabla 6**).

Tabla 6. Método cuantitativo del crecimiento de *S. mutans* en disoluciones seriadas de extracto etanólico de la hoja de *C. sinensis* y extracto metanólico de *B. orellana*.

Crecimiento	Stock 1000 mg/ml	500 mg/ml	250 mg/ml	125 mg/ml	62.5 mg/ml	31.25 mg/ml	15.625 mg/ml	7.812 mg/ml	CP	CN
En tubo (CS)	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
En placa (CS)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
En tubo (BO)	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
En placa (BO)	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

CP: control positivo (agar BHI con inoculación de *Streptococcus mutans* sin extracto etanólico de *Camellia sinensis*), CN: control negativo (agar BHI con extracto etanólico de *Camellia sinensis* puro sin microbios). Con crecimiento (+), sin crecimiento (-). CS: *Camellia sinensis*, BO: *Bixa orellana*.

8. DISCUSIÓN

El uso de las plantas como medicina natural utilizada para tratar y prevenir diversas enfermedades es un tema que implica gran relevancia en términos de salud pública estomatológica. Por ello, el propósito de este estudio fue evaluar

la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *B. orellana* en comparación con el extracto etanólico de *C. sinensis*, frente a *S. mutans* a las 24, 48 y 72 horas; lo que según los resultados obtenidos se rechazó la hipótesis nula.

En la presente investigación, los resultados demostraron que el extracto etanólico de la hoja de *C. sinensis* al 100% presentó la mayor actividad antibacteriana, seguido del extracto metanólico de la hoja de *B. orellana* al 100% a las 24 horas, del extracto etanólico de la hoja de *C. sinensis* al 75% a las 48 horas, y del extracto metanólico de *B. orellana* al 100% a las 72 horas. Siendo la actividad antibacteriana mayor al de la clorhexidina 0,12% en los diferentes tiempos. Observándose un incremento de esta actividad a las 48 horas y disminución a las 72 horas. Además, se hallaron las CMI del extracto etanólico de la hoja de *C. sinensis* (250 mg/ml), y del extracto metanólico de la hoja de *B. orellana* (125 mg/ml), y las CMB, siendo de 500 mg/ml para ambos extractos.

La actividad antimicrobiana de *C. sinensis* se le atribuye a las catequinas, principalmente a la epigalocatequina- 3-galato (EGCG), que se encuentra de manera más abundante y representa el 50% del conjunto de catequinas en total ⁽¹⁷⁾. Se ha demostrado que la EGCG provoca una alteración irreversible de la membrana de las bacterias ⁽²⁸⁾ e inhibe la girasa del ADN bacteriano, evitando así el superenrollamiento del ADN y provocando la muerte de las células bacterianas ⁽²⁹⁾. Además, la actividad específica contra el *S. mutans* se basa en que EGCG interfiere con la adhesión bacteriana al esmalte dental y suprime la bacción de la glucosiltransferasa y la amilasa, lo que reduce la producción de ácido láctico en la superficie dental ⁽³⁰⁻³²⁾. Sin embargo, parece ser que el éxito del efecto antibacteriano de *C. sinensis* no solo se debe exclusivamente a esta catequina, ya que según un estudio realizado por Sasaki et al ⁽³³⁾, la combinación

de EGCG, con galato de galocatequina (GCG) y galato de catequina (CG) mostró una actividad antibacteriana más fuerte contra el *S. mutans*, que las mismas catequinas por separado.

De forma similar, la acción antimicrobiana de *B. orellana*, podría deberse a los flavonoides y alcaloides que posee, ya que se ha observado su capacidad de formar complejos de proteínas y paredes celulares bacterianas y lipofílicas, así como la ruptura de membranas bacterianas ⁽³⁴⁾. Además, otros estudios describen que las actividades antioxidantes y antimicrobianas del extracto de *B. orellana*, se le atribuyen a los compuestos bioactivos que se encuentran en las semillas, como el carotenoide bixina (bixina o 6-metil hidrógeno (9Z)-6,6'-diapocaroteno-6) y compuestos polifenólicos existentes en sus diferentes partes como la catequina, ácido clorogénico, crisina, buteína, hipoaletina y xantoangelol ⁽³⁵⁾, los cuales inhibirían la producción de radicales libres y desnaturalizarían las proteínas presentes en la estructura celular de algunos microorganismos para evitar su proliferación ⁽³⁶⁻³⁹⁾.

En esta investigación el extracto etanólico de *C. sinensis* a una concentración de 1000 mg/ml (100%) presentó la mayor actividad antimicrobiana frente a *S. mutans* comparada con el extracto metanólico de *B. orellana* y la clorhexidina 0.12% a las 24, 48 y 72 horas. Alcanzando su máxima actividad antibacteriana a las 48 horas con un halo de inhibición de 22.25 mm, clasificándose esto como sumamente sensible según la escala de Duraffourd ^(25,26). Estos resultados coinciden con lo reportado por Otake et al. ⁽⁴⁰⁾, quienes mostraron que un extracto crudo de *C. sinensis* llamado "Sunphenon", tenía la capacidad de evitar la adherencia de *S. mutans* a la hidroxiapatita de la superficie dental y de inhibir la

enzima glucosiltransferasa. Así mismo demostraron *in vivo* que cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta enriquecida con Sunphenon, la formación de caries se inhibió en gran medida. Sin embargo, los resultados de Otake *et al.* ⁽⁴⁰⁾ difieren de lo reportado por Cayo *et al.* ⁽⁴¹⁾, quienes realizaron un estudio obteniendo *C. sinensis* del mismo lugar de cultivo del presente estudio, donde el extracto etanólico al 20% mostró su mayor halo de inhibición de 18.64 mm a las 24 horas sobre *S. mutans*, siendo sensible frente al extracto según la escala de Duraffourd. Estas diferencias podrían deberse a los bajos porcentajes en las concentraciones usadas, ya que se ha observado con frecuencia que a una mayor concentración del extracto, mayor es el efecto antimicrobiano ⁽⁴¹⁾.

Por otro lado, el extracto metanólico de *B. orellana* a una concentración de 1000 mg/ml (100%), presentó el segundo mayor halo de inhibición a las 24, 48 y 72 horas. Alcanzando su máxima actividad antibacteriana a las 48 horas con un halo de inhibición de 20.84 mm, clasificándose como sumamente sensible según la escala de Duraffourd. Estos resultados son similares a lo reportado por Medina *et al.* ⁽¹⁵⁾ quienes realizaron un estudio donde el extracto metanólico de las hojas de *B. orellana* evidenció un halo de inhibición de 19.97 ± 1.31 mm contra *S. mutans*, clasificándose entre muy sensible a sumamente sensible según la escala de Duraffourd, y la CMI fue de 62.5 $\mu\text{g/mL}$. De igual manera evaluaron el extracto de las semillas, el cual tuvo una actividad de 15.11 ± 1.03 mm contra *S. mutans*, observándose un menor efecto en comparación al extracto de la hoja, siendo la CMI del extracto de semilla de 31.25 $\mu\text{g/mL}$. Según Medina *et al.* ⁽¹⁵⁾ estas diferencias en las CMI de los extractos metanólicos de la hoja y la semilla, podría estar relacionado con el hecho de que los principios activos antibacterianos obtenidos en las hojas y semillas de las plantas pueden aislarse

en diferentes concentraciones, y que la mayor eficiencia en el extracto de las hojas en comparación con el extracto de las semillas puede deberse a la ausencia de alcaloides en las semillas. Cabe resaltar que el presente estudio y el estudio realizado por Medina *et al*,⁽¹⁵⁾ se realizaron con *Bixa orellana* proveniente del Perú.

Sin embargo, en un estudio realizado en Brasil por dos Santos *et al*⁽¹²⁾, donde se le agregó extracto etanólico crudo de las semillas de *B. orellana* a unos selladores endodónticos, se observó un efecto antibacteriano considerable tan solo después de 24 h de incubación contra *S. mutans* y la CMI fue de 3.12 mg/ml. Esta diferencia con el presente estudio, en el mayor efecto y en el menor tiempo podría deberse a que dos Santos *et al*⁽¹²⁾ emplearon *B. orellana* cultivada en Brasil, y al realizarse en otra zona geográfica, podría haber influido en la concentración de los componentes químicos antibacterianos de *B. orellana*^(42,43), además se utilizó el extracto de las semillas, que de todas las partes de *B. Orellana* es la que posee el mayor contenido de carotenoides (44), como la bixina, que aunque también se ha aislado de las hojas y la corteza, su concentración es mayor en las semillas⁽⁴⁵⁾. A pesar de este argumento, estos resultados difieren de lo reportado por Medina *et al*.⁽¹⁵⁾ y por Rojas *et al*⁽⁷⁾, quienes realizaron un estudio en Colombia, donde el extracto etanólico de las semillas de *B. orellana* no tuvo mayor efecto contra *Streptococcus* β hemolítico comparado con el control positivo (clindamicina). Otorgándole mayor razón al argumento de que la zona geográfica sería determinante en la composición de las especies vegetales^(42,43). Además, dos Santos *et al*⁽¹²⁾, utilizaron el etanol como solvente para extraer los compuestos activos de *B. orellana*, el cual es capaz de extraer constituyentes como los terpenos, siendo los más importantes

los carotenoides, entre ellos la Bixina, que se encuentra de forma abundante en las semillas de *B. orellana* ^(35,46). Por último, estas diferencias podrían también deberse a que dos Santos *et al*, ⁽¹²⁾ obtuvieron el extracto mediante el proceso de liofilización, lo que permitiría una mejor conservación de sus principios activos y sus propiedades fitoquímicas ^(47,48).

Es importante resaltar también, que la presencia de compuestos fenólicos en ambas especies vegetales, *B. orellana* y *C. sinensis* en dependencia de su concentración, pudiera influir en la estabilidad de las propiedades antimicrobianas que presenta el producto en el transcurso del tiempo ^(42,43). lo que bien pudiera explicar la disminución del efecto antimicrobiano de los extractos de *C. sinensis* y *B. orellana* al alcanzar las 48 horas hasta las 72 horas, obtenido en la presente investigación.

La clorhexidina tiene un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y tiene una gran capacidad para adsorberse en el tejido dental y las membranas mucosas con liberación gradual prolongada a niveles terapéuticos, se encuentra en la lista de los Antisépticos Esenciales de la Organización Mundial de la Salud y sigue siendo el tratamiento de elección en la práctica odontológica, como control o referencia en la evaluación de la eficacia de los enjuagues bucales y es considerado el “gold estándar” en los ensayos clínicos e *in vitro*, así como para la evaluación de la potencia de nuevos antimicrobianos. A pesar de esto, se han reportado efectos secundarios no deseados. Razón por la cual las sustancias que tienen una eficacia terapéutica similar y menos efectos secundarios deberían estudiarse y utilizarse en el campo odontológico ^(49,50). Se sabe que el mecanismo de acción antibacteriana de la

clorhexidina se debe a que bloquea los grupos de ácidos libres (sulfatos, carboxilos y fosfatos) y esto impide o disminuye la adhesión y coagregación bacteriana, además la clorhexidina se une a las cargas negativas que se hallan sobre la pared celular de la bacteria y de esta forma dificulta el mecanismo de adherencia entre ellas ⁽⁴¹⁾.

Actualmente, los productos naturales derivados de las plantas para el manejo y control de las enfermedades, han cobrado importancia por su efectividad a bajo costo ^(16,41). Por ello, la importancia de esta investigación radica en que aporta información relevante sobre las propiedades antimicrobianas del extracto etanólico de *C. sinensis* y el extracto metanólico de *B. orellana* frente a *S. mutans*, ya que esta bacteria demostró ser sumamente sensible a ambos productos. Esto sienta las bases para realizar futuras investigaciones que puedan enriquecer más el conocimiento para la creación de productos a base de estas especies vegetales, que puedan ser utilizados como colutorios o pastas dentales, así como ingredientes aditivos en los diferentes materiales odontológicos con el fin de prevenir y combatir la caries dental.

Dentro de las limitaciones de este estudio se reconoce que no se consideró identificar específicamente los componentes químicos de cada extracto, lo cual hubiese permitido conocer con mayor claridad el componente que le atribuye la actividad antibacteriana. Si bien se determinó una concentración mínima inhibitoria y bactericida, no se determinó una concentración mínima de citotoxicidad, lo cual es relevante si se pretende sentar las bases para un futuro estudio en seres humanos.

9. CONCLUSIONES

A una concentración del 100%, el extracto etanólico de *Camellia sinensis* y el extracto metanólico de *Bixa orellana*, presentaron su mayor actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans* a las 48 horas; siendo el extracto de *Camellia sinensis* más efectivo en comparación al extracto de *Bixa orellana*. Sin embargo, este efecto antibacteriano disminuyó en ambos extractos a las 72 horas.

10. RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar la actividad antimicrobiana de los principios activos de *C. sinensis* como las catequinas, en especial de la EGCG, así como de los principios activos de *B. orellana* en sus diferentes partes tanto la semilla, como la hoja y la raíz y determinar qué estructura posee el máximo potencial antimicrobiano, se recomienda también profundizar en el estudio de la concentración de citotoxicidad de *C. sinensis* y *B. orellana*, así como la evaluación de las posibles sinergias con antibióticos sintéticos, con el fin de incrementar su efectividad. Se recomienda, por último, evaluar ambos extractos en muestras clínicas, provenientes de seres humanos.

BIBLIOGRAFIA

1. Zhan L. Rebalancing the Caries Microbiome Dysbiosis: Targeted Treatment and Sugar Alcohols. *Advances in Dental Research*. 2018; 29(1): 110–116. doi:10.1177/0022034517736498.
2. Ojeda JC, Oviedo E, Salas LA. Streptococcus mutans y caries dental. *Rev. CES Odont*. 2013; 26(1): 44-56.
3. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiology Spectrum*. 2019; 7(1):1-26. doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018
4. Sampaio FC, Bönecker M, Paiva SM, Martignon S, Ricomini Filho AP, Pozos Guillen A, et al. Dental caries prevalence, prospects, and challenges for Latin America and Caribbean countries: a summary and final recommendations from a Regional Consensus. *Brazilian oral research*. 2021; 35(01): e056. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0056>
5. Kudsi Z, Fenlon MR, Hill K, Baysan A. Developing a questionnaire to measure psychological disturbance associated with tooth loss. *Journal of Dentistry*. 2020; 98:103353. doi:10.1016/j.jdent.2020.103353
6. Cayo-Rojas C, Gerónimo-Nieto E, Aliaga-Mariñas A. Salivary pH changes caused by cariogenic and non-cariogenic food intake in preschoolers from Huaura, Peru. *Rev Cuba Estomatol*. 2021;58(4):e3518
7. Rojas JJ, Ochoa VJ, Ocampo SA, Muñoz JF. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006;6:2. doi:10.1186/1472-6882-6-2
8. Maguiña Vargas Ciro. Infecciones nosocomiales. *Acta méd. Peru*. 2016;33(3):175-177.
9. Yoo S, Murata RM, Duarte S. (2011). Antimicrobial Traits of Tea- and Cranberry-Derived Polyphenols against Streptococcus mutans. *Caries Research*. 2011; 45(4): 327–335. doi:10.1159/000329181
10. Shah PM. The need for new therapeutic agents: what is in the pipeline? *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 11:36-42.
11. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives Supplements*. 2001; 109:69-75.
12. Dos Santos DC, da Silva Barboza A, Schneider LR, Cuevas-Suárez CE, Ribeiro JS, Damian MF, et al. Antimicrobial and physical properties of experimental endodontic sealers containing vegetable extracts. *Scientific Reports*. 2021; 11(1):6450. doi:10.1038/s41598-021-85609-4
13. Fleischer TC, Ameade EPK, Mensah MLK, Sawyer IK. Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*. 2003; 74:136-38.

14. Irobi ON, Moo-Young M, Anderson WA. In vitro clonal propagation of annatto (*Bixa orellana* L.). *Pharm Biol.* 1996;34:87.
15. Medina D, Ulloa G, Camere R, Caballero S, Mayta F, del Valle J. Antibacterial activity of *Bixa orellana* L. (achiote) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* 2016; 6(5): 400–403. doi:10.1016/j.apjtb.2016.03.005
16. Alim S, Bairagi N, Shahriyar S, Kabir M. In vitro antibacterial potential of *Bixa orellana* L. against some pathogenic bacteria and comparative investigation on some standard antibiotics. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2016; 5(2): 178-181.
17. Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chin Med.* 2010; 5: 1–13.
18. Schneider C, Segre T. Green tea potential health benefit. *Am Fam Physician.* 2009; 79: 591–594.
19. Taylor PW, Hamilton-Miller JMT, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull.* 2005; 2: 71–81.
20. Araghizadeh A, Kohanteb J, Fani MM. Inhibitory Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract on Some Clinically Isolated Cariogenic and Periodontopathic Bacteria. *Medical Principles and Practice.* 2013; 22(4): 368–372. doi:10.1159/000348299
21. Matsumoto M, Minami T, Sasaki H, Soube H, Hamada S, Ooshima T. *Caries Res.* 1999;33:441.
22. Irasawa M, Tanaka T, Otake S. *Caries Res.* 2006; 40:65.
23. Saito N. Anti-caries effects of polyphenol compound from *Camellia sinensis*. *Nichidai Koko Kagaku.* 1990;6(2):154.
24. Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, De Natale A, Pollio A. Anti-cariogenic effects of polyphenols from plant stimulant beverages (cocoa, coffee, tea). *Fitoterapia.* 2009; 80(5): 255–262. doi:10.1016/j.fitote.2009.04.006
25. Duraffourd C, Lapraz JC. *Clinical Phytotherapy Notebooks.* Mexico: Editorial Masson; 1986.
26. Guevara L, Bonilla P, Caicedo M. Antimicrobial activity of orthodontic adhesive with silver nanoparticles on *Streptococcus mutans*. *Revista Odontología.* 2020; 22(2):33–44. doi: 10.29166/odontologia.vol22.n2.2020-33-44.
27. Parvekar P, Palaskar J, Metgud S, Maria R, Dutta S. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomater. investig. dent.* 2020; 7(1): 105–109. DOI:10.1080/26415275.2020.1796674.
28. Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1147:132–136.
29. Gradisar H, Pristovsek P, Plaper A, Jerala R. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *J Med Chem.* 2007; 50:264–271.

30. Sakanaka S, Okada Y. Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. *J Agric Food Chem*. 2004; 52:1688–1692.
31. Hattori M, Kusumoto IT, Namba T, Ishigami T, Hara Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Chem Pharm Bull*. 1990; 38:717–720.
32. Hamilton-Miller JMT. Anticariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol*. 2001; 50: 299–302.
33. Sasaki H, Matsumoto M, Tanaka T, Maeda M, Nakai M, Hamada S, Ooshima T. Antibacterial activity of polyphenol components in Oolong tea extract against *Streptococcus mutans*. *Caries Res*. 2004; 38: 2–8. doi: 10.1159/000073913
34. Biswas SJ, Giri SK, Saha NC, Raha S, Pandey A. Phytochemical evaluation, acute toxicity studies and antimicrobial efficacy of seed extract of *Bixa orellana*: A plant grown in wild in Purulia district. *J. Pharma. Phytochem*. 2018; 7:2065–2071
35. Quintero J, Naranjo AM, Silva M, Ciro GL, Rojas JJ. Ultrasound-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Annatto Seeds, Evaluation of Their Antimicrobial and Antioxidant Activity, and Identification of Main Compounds by LC/ESI-MS Analysis. *Int. J. Food Sci*. 2019; 1-9. doi: 10.1155/2019/3721828.
36. Viuda M, Ciro GL, Ruiz Y, Zapata JE, Sendra E, Pérez JA, Fernández J. In vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts from Annatto (*Bixa orellana* L.) Leaves and Seeds. *J. Food Saf*. 2012;32:399–406. doi: 10.1111/j.1745-4565.2012.00393.x.
37. Campos R, Yamashita F, Cesar F, Zerlotti A. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *J. Chromatogr. A*. 2011;1218:57–63. doi: 10.1016/j.chroma.2010.10.094.
38. Butnariu M. Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products. *J. Ecosyst. Ecography*. 2016;6:1–19. doi: 10.4172/2157-7625.1000193.
39. Shahid-ul-Islam, Rather LJ, Mohammad F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications—A review. *J. Adv. Res*. 2016;7:499–514. doi: 10.1016/j.jare.2015.11.002
40. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. *Caries Res*. 1991;25: 438–443.
41. Cayo C, Cervantes L. Antibacterial activity of *Camellia sinensis* versus propolis against *Streptococcus mutans*. *Rev Cubana Estomatol*. 2020;57(1):e2967.
42. González L, Díaz R, Castillo C, Nieto A, Méndez D. Phenolic compounds: presence, identification and antioxidant activity in plants and fruits. *Mex J Bio Technol*. 2017; 2(1):46-64. doi:10.29267/mxjb.2017.2.1.46

43. Paucar E, Peltroche N, Cayo C. Antibacterial and Antifungal Activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* against oral microorganisms. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2021;40(5):e1450
44. Melka B, Bisrat D, Babu GN. Isolation, Characterization and Biological Activities of Food Colorants from *Bixa orellana*. *Journal of Pharmacovigilance*. 2017;5:4. doi:10.4172/2329-6887.1000237
45. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J, Rivera-Madrid R. The biotechnology (genetic transformation and molecular biology) of *Bixa orellana* L. (achiote). *Planta*. 2018; 248(2): 267–277. doi:10.1007/s00425-018-2909-7.
46. Conrad OA, Dike IP, Agbara U. In vivo antioxidant assessment of two antimalarial plants- *Allamanda cathartica* and *Bixa orellana*. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013; 3(5): 388–394. doi:10.1016/S2221-1691(13)60082-9
47. Bjelošević M, Zvonar A, Planinšek O, Ahlin P. (2020). Excipients in freeze-dried biopharmaceuticals: contributions toward formulation stability and lyophilisation cycle optimisation. *Int. J. Pharm.* 2020; 576: 119029. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119029
48. Gonçalves O, Alves M, Grácio J, Nunes V. A comparative study of raspberry dehydration by lyophilisation or conventional drying. *Int. Adv. Res. Eng. J.* 2018;2(3):267-272.
49. Castilho AL, Saraceni CHC, Díaz IEC, Paciencia MLB, Suffredini IB. New trends in dentistry: plant extracts against *Enterococcus faecalis*. The efficacy compared to chlorhexidine. *Brazilian Oral Research*. 2013; 27(2): 109–115. doi:10.1590/s1806-83242013000100017
50. Baena ES, Piloni J, Santos EM, Gómez CA, Rangel E, Castro J. Comparison of the Antimicrobial Activity of *Hibiscus sabdariffa* Calyx Extracts, Six Commercial Types of Mouthwashes, and Chlorhexidine on Oral Pathogenic Bacteria, and the Effect of *Hibiscus sabdariffa* Extracts and Chlorhexidine on Permeability of the Bacterial Membrane. *Journal of Medicinal Food*. 2021;24(1):67-76. doi:10.1089/jmf.2019.0273
51. Cuyo M, Rocío M del. Estudio in vitro del efecto inhibitorio del extracto de achiote (*bixa orellana*) sobre cepas de *Streptococcus mutans* [Internet] [Tesis para optar al Título Profesional de Cirujano Dentista]. [Ecuador]: Universidad Central Del Ecuador; 2019 [citado el 30 de julio de 2019]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/18333>
52. Collantes Vargas M. Efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto hidroetanólico de hojas de *Bixa orellana* L. (achiote) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo – 2018 [Internet] [Tesis para optar al Título Profesional de Cirujano Dentista]. [Perú]: Universidad Católica los Ángeles Chimbote; 2019 [citado el 31 de julio de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/11173>
53. Pumajica Silvestre Y. Efecto antibacteriano de la infusión de *Camellia Sinensis* (Te Verde) sobre *Streptococcus Mutans* en cepillos dentales de estudiantes de I.e.s. San Antonio de Padua, Puno -2015 [Internet] [Tesis para optar al Título Profesional de Cirujano Dentista]. [Perú]: Universidad Nacional del Altiplano; 2015 [citado el 31 de julio de 2019]. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/2561>

54. Ferreira DCA, Polizeli SAF, Da Silva LAB, K uchler EC, De Rossi A. Antibacterial Efficacy of Epigallocatechin-3-gallate against Streptococcus mutans: A Systematic Review / Eficacia antibacteriana de la epigallocatequina-3-galato contra el Streptococcus mutans: Revisión Sistemática. Univ Odontol [Internet]. el 28 de julio de 2017 [citado el 30 de julio de 2019];36(76). Disponible en: <http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/19878>

ANEXO

ANEXO N° 01: OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	TIPO	ESCALA	VALORES O ÍNDICES
Hoja de <i>Bixa orellana</i> (Variable independiente)	Es una especie botánica arborescente de las regiones intertropicales de América. ¹⁸	Concentración del extracto metanólico.	200mg/ml o 20%	Cualitativo	Nominal	Si / No
Hoja de <i>Camellia sinensis</i> (Variable independiente)	Es una especie de planta arbustiva de cuyas hojas y brotes tiernos se elabora el famoso té verde. ⁹	Concentración del extracto etanólico.	200mg/ml o 20%	Cualitativo	Nominal	Si / No
Actividad Antibacteriana (Variable dependiente)	Es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla, y que se puede expresar cuantitativamente con pruebas in vitro. ¹⁷	Medida del halo de inhibición.	Diámetro del halo en milímetros por el método de Kirby Bauer	Cuantitativo	Continua / Razón	0 a más

ANEXO N° 02: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS																															
MUESTRA	BACTERIA	TIEMPO DE LECTURA/Hrs.	GRUPOS / mm																												
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
CONTROL (+): clorhexidina al 0,12%	<i>Streptococcus mutans</i>	24 Hrs.																													
24 Hrs.																															
24 Hrs.																															
24 Hrs.																															
24 Hrs.																															

***Ficha de recolección tomada de Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco por difusión. Instituto Nacional de Salud (INS), 2002**

ANEXO N°03: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLE		
	General	General	General	Dimensión	Indicador	Nivel de Medición
“EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA IN VITRO DE BIXA ORELLANA EN COMPARACIÓN A CAMELLIA SINENSIS FRENTE AL STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175)”	¿Qué solución ofrece mayor actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de Bixa Orellana y el extracto etanólico de Camellia sinensis, frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175)?	•Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de Bixa Orellana y el extracto etanólico de Camellia sinensis, frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175).	•El extracto metanólico de Bixa Orellana presentaría diferencias significativas en comparación al extracto etanólico de Camellia sinensis, respecto a la actividad antibacteriana frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175).	Extracto metanólico de Bixa orellana	200mg/ml o 20%	Explicativo, porque se evaluará una relación de causa y efecto
	Específicos	Específicos	Específicos	Extracto etanólico de Camellia sinensis	200mg/ml o 20%	
	<ul style="list-style-type: none"> •¿Cuál es la CMI y CMB que presenta el extracto metanólico de Bixa Orellana y el extracto etanólico de Camellia sinensis, frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175)? •¿Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de Bixa Orellana, el extracto etanólico de Camellia sinensis y la solución control, frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175), a las 24, 48 y 72 horas? •¿Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de Bixa Orellana, el extracto etanólico de Camellia sinensis y la solución control, frente al Streptococcus 	<ul style="list-style-type: none"> •Evaluar la alteración del color in vitro que presentan dos resinas Bulk Fill, después de ser sumergidas en Coca-Cola a las 3, 12 y 24 horas. •Evaluar la alteración del color in vitro que presentan dos resinas Bulk Fill, después de ser sumergidas en vino tinto a las 3, 12, y 24 horas. •Evaluar la alteración del color in vitro que presentan dos resinas Bulk Fill, después de ser sumergidas en café a las 3, 12 y 24 horas. •Evaluar la alteración del color in vitro que presentan dos resinas Bulk Fill, después de ser 	<ul style="list-style-type: none"> •Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de Bixa Orellana, el extracto etanólico de Camellia sinensis y la solución control, frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175), a las 24, 48 y 72 horas. •Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de Bixa Orellana, el extracto etanólico de Camellia sinensis y la solución control, frente al Streptococcus mutans 	Halo de inhibición / milímetros	Diámetro del halo	

	<p>mutans (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas?</p> <p>•¿Existen diferencias significativas de la variación de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de Bixa Orellana, el extracto etanólico de Camellia sinensis y la solución control, frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas?</p>	<p>sumergidas en té verde a las 3, 12,y 24 horas.</p>	<p>(ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas.</p> <p>•Existen diferencias significativas de la variación de la actividad antibacteriana al comparar el extracto metanólico de Bixa Orellana, el extracto etanólico de Camellia sinensis y la solución control, frente al Streptococcus mutans (ATCC 25175), entre las 24, 48 y 72 horas..</p>			
TIPO Y DISEÑO		POBLACION Y MUESTRA	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS	METODO DE ANALISIS ESTADISTICO		
<p>- Tipo: Prospectivo, Analítico, Longitudinal, Comparativo.</p> <p>-Diseño: Experimental in vitro.</p>		<p>La población estará conformada por 112 discos de difusión.</p>	<p>Técnica: Observación</p> <p>Instrumento: El instrumento de medición a utilizar, es el vernier digital.</p> <p>Se usará una ficha de recolección de datos aprobado por el INS</p>	<p>Los datos fueron recolectados en una ficha ad hoc e ingresados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel 2019[®], posteriormente fueron exportados y procesado con el paquete estadístico SPSS[®] versión 24. Para el análisis descriptivo se utilizó medidas de tendencia central y dispersión, como la media y la desviación estándar. Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de homocedasticidad de Levene, cuyos resultados demostraron que los datos reunían los requisitos para aplicar el test de ANOVA de un factor intergrupos con el post hoc de Tukey en el caso del extracto de <i>Camelia sinensis</i>. Sin embargo, esto no se cumplió en el caso del extracto de <i>Bixa orellana</i>, por ello se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis con el post</p>		

			<p>hoc de Bonferroni. Además, para comparar las medidas relacionadas tanto para el extracto de <i>Camellia sinensis</i> como para el extracto de <i>Bixa orellana</i> se evaluó la distribución normal y esfericidad (Test de Shapiro Wilk y Test W de Mauchly, respectivamente) de las diferencias de medias entre tiempos. Al verificar el cumplimiento de los supuestos estadísticos se utilizó el test de ANOVA de un factor intragrupos con la corrección post hoc de Bonferroni. En todas las pruebas estadísticas se consideró un nivel de significancia al 95 % ($p < 0.05$).</p>
--	--	--	---

ANEXO N° 04: EVIDENCIAS FOTOGRAFICAS

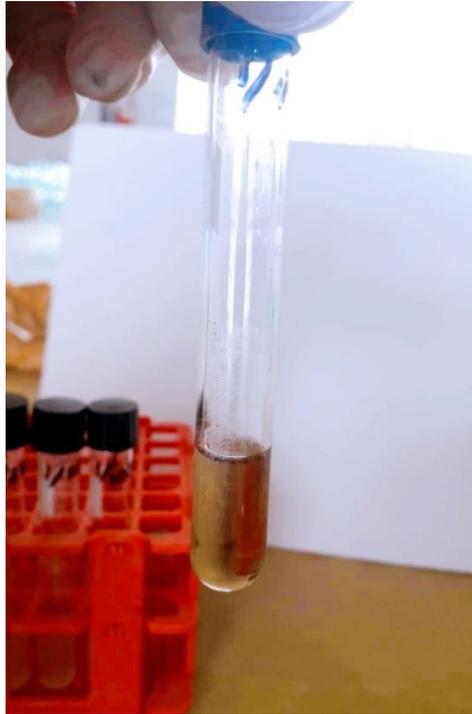


Figura 1: CMI del *Camellia sinensis*



Figura 2. CMI del *Bixa orellana*

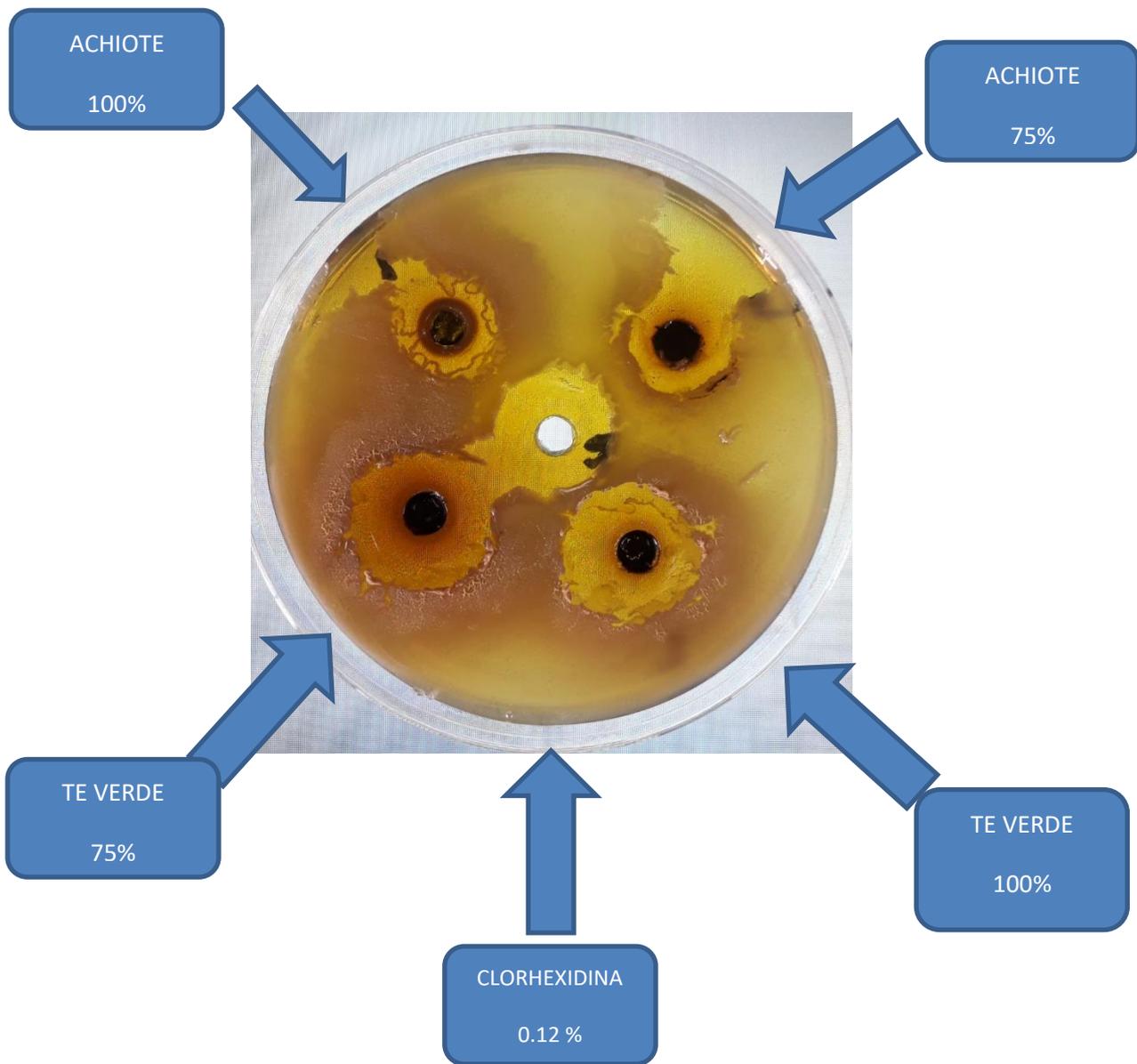


Figura 3. Comparación del achiote y el té verde a las 48 horas