



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE
LA SALUD**

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

TESIS

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTISÉPTICO DEL
ENJUAGUE BUCAL ELABORADO A BASE DEL ACEITE
ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS FRESCAS DE
Minthostachys mollis "MUÑA" FRENTE AL *Streptococcus mutans***

**PRESENTADO POR
BACH. REYES ROJAS, YÚRIKO**

HUACHO – 2015

DEDICATORIA

A mis padres Héctor y Ana, por ser mi ejemplo a seguir, gracias por todo el apoyo, paciencia y amor incondicional.

A mi esposo Jeyson, a mis hermanos Jaime y Lisbeth y en especial a mis sobrinas: Jimena, Maitte y Harumi; a quienes siempre llevare en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional.

Al Q.F Guillermo José Gallardo Vásquez por su ejemplo profesional y humano,
su asesoría y ayuda en la realización del presente trabajo.

Al Ing. Jeyson Flores, por darme siempre su ayuda desinteresada, por su amor,
consejos y ayuda en la ejecución de este trabajo.

Al Dr. Q.F Mario Carhuapoma Yance por su ayuda, motivación y amistad.

A mi Alma Mater “Universidad Alas Peruanas” – Filial Huacho por haberme
permitido realizar mis estudios.

RESUMEN

La presente investigación evaluó el efecto antiséptico “*in vitro*” del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Minthostachys mollis* “Muña” frente al *Streptococcus mutans*, se empleó concentraciones al 25%, 50% y 100% del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Minthostachys mollis* “Muña”.

Se usó una cepa patrón de *Streptococcus mutans* la cual se obtuvo del Instituto Nacional de Salud, se reactivó y sembró en placas con medio de cultivo Agar Trypticasa Soya (TSA).

Para la prueba de efectividad bacteriana se usó discos de papel de filtro estériles que fueron embebidos con enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial de muña al 0.003%, 0.0015% y 0.00075%, se usó como control negativo DMSO (dimetilsulfóxido). Cada disco se colocó de manera ordenada y equidistante en el medio de cultivo; se incubó a 37 ° C por 48 horas; transcurrido el tiempo se realizó las mediciones de los halos de inhibición utilizando un vernier. El enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.003% obtuvo un promedio de 11.328 milímetros, el enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.0015% obtuvo un promedio de 7.349 milímetros, el enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.00075% obtuvo un promedio de 5 milímetros igual que el control negativo (Dimetilsulfóxido). Se aplicó pruebas estadísticas inferenciales como ANNOVA one way y prueba post hoc de Tukey concluyendo que el enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial de muña al 0.003% presenta el mayor efecto antiséptico comparado con los otros enjuagues elaborados a base del aceite esencial del *Minthostachys mollis* “Muña” de 0.0015% y 0.00075%.

Palabras claves: *Minthostachys mollis*, aceite esencial, enjuague bucal, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

This present investigation evaluates the antiseptic effect “*in vitro*” of the oral rinse formulate base on the oil from the fresh leaves of *Minthostachys mollis* “Muna” on *Streptococcus mutans*; one used concentrations of the oil obtained from the fresh leave of *Minthostachys mollis* at 25%, 50 % and 100 %.

The pattern of *Streptococcus mutans* strain was obtained from Instituto Nacional de Salud, it was revived and plated in culture medium with trypticase Soy Agar (TSA).

For the effectiveness bacterium test was use paper discs of sterile filters, and they were soaked with the oral rinse formulated with the essential oil of the muna at 0.003%, 0.0015% and 0.00075%. As a negative control, it was used the DMSO (DimethylSulfoxide). Each disc was placed in an orderly and equidistantly in the culture medium; incubated at 37 ° C for 48 hours. After certain period of time, measurements of the halos of inhibition were performed using vernier. The oral rinse formulated with the essential oil of *Minthostachys mollis* at 0.003% scored average of 11.328 millimeters, the oral rinse formulated with the essential oil of *Minthostachys mollis* at 0.0015% scored average of 7.349 millimeters, the essential oil *Minthostachys mollis* at 0.00075% scored average of 5 millimeters (size disks) as the negative control (dimethyl sulfoxide). It was applied inferential statistical methods such as ANNOVA one way and the Tukey’s Post Hoc to conclude that the oral rinse formulated with the essential oil of the muna at 0.003% shows a major antiseptic effect in comparison with the oral rinse formulated with the essential oil of *Minthostachys mollis* at 0.0015% and 0.00075%.

KEY WORDS: *Minthostachys mollis*, essential oil, oral rinse, *Streptococcus mutans*.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| CARÁTULA | |
| DEDICATORIA | I |
| AGRADECIMIENTOS | II |
| RESUMEN | III |
| ABSTRACT | IV |
| ÍNDICE | V |
| INTRODUCCIÓN | VI |
| CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | |
| 1.1. Descripción de la realidad problemática | 1 |
| 1.2. Delimitación de la investigación | 2 |
| 1.3. Formulación del Problema | 3 |
| 1.4. Objetivos de la investigación..... | 3 |
| 1.5. Hipótesis de la investigación | 4 |
| 1.6. Justificación de la investigación | 5 |
| CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO | |
| 2.1. Antecedentes de la investigación..... | 6 |
| 2.2. Bases teóricas..... | 13 |
| CAPÍTULO III: METODOLOGÍA | |
| 3.1. Tipo de la investigación..... | 36 |
| 3.2. Diseño de la investigación..... | 36 |
| 3.3. Población y muestra de la investigación | 36 |
| 3.4. Variables, dimensiones e indicadores | 36 |
| 3.5. Técnicas e instrumentos de la recolección de datos | 37 |
| 3.6. Procedimientos | 47 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS | |
| 4.1. Resultados | 48 |
| 4.2. Discusión de los resultados..... | 57 |
| CONCLUSIONES | 62 |
| RECOMENDACIONES | 63 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 64 |
| ANEXOS | 71 |

INTRODUCCIÓN

El interés por el uso de productos naturales para el tratamiento de enfermedades de importancia pública ha incrementado en la actualidad, lo que en gran medida se sustenta en la tendencia al desarrollo de tratamientos no convencionales, justificándose en muchos casos por razones económicas, en residualidad o de disminución de los efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones en lo que destaca un papel indispensable la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁷⁰

El 90% de la población según MINSA padece de caries dental, patología que destruye el diente por descalcificación de las estructuras calcificadas de los dientes y un 50% de halitosis, o también llamada mal aliento, que se define como el conjunto de olores desagradables u ofensivos que emanan de la cavidad bucal.⁶³

La cavidad oral es habitada por una microflora mixta e inespecífica que encuentra condiciones ideales para su sobrevivencia. Esta se caracteriza por ser extraordinariamente compleja en género y especie. Siendo los estreptococos el grupo más numeroso de bacterias, se presentan con mayor frecuencia en las infecciones bucales. El *Streptococcus mutans*, ha sido señalado como el agente etiológico de la caries dental. Entre los factores de patogenicidad en el *Streptococcus mutans* destaca: poder acidogénico, acidófilo y acidúrico; síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insoluble y solubles, fructanos; síntesis de polisacáridos intracelulares; capacidad adhesiva por la proteínas salivales; producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos.⁴⁴

Actualmente para la disminución de la carga microbiana de la cavidad oral se usan medios mecánicos y químicos. Dentro de los medios mecánicos el cepillado de los dientes es uno de los métodos más confiables para la disminución de esta, también es importante el uso de agentes químicos que actúen como coadyuvantes y como reemplazo de los sistemas de la formación de la placa bacteriana.⁴⁴

Los enjuagatorios bucales son de gran importancia para la disminución de la carga microbiana.⁴⁴

Por ello teniendo en cuenta la diversidad vegetal de nuestro país y el empleo de plantas medicinales para combatir ciertas enfermedades, se hace necesario rescatar estos recursos en beneficio de la población, como es el uso de la “muña” *Minthostachys mollis*, planta oriunda de la sierra del Perú, su uso ampliamente difundido en diversas regiones del país, se debe por sus propiedades curativas, las cuales atribuyen a sus componentes, entre los cuales destaca el aceite esencial ya que actúa dependiendo del tipo de microorganismo y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos, además que interferirían en la fase de metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción.^{13, 38}

Esta investigación pretende evaluar el efecto antiséptico *in vitro* del aceite esencial a base de hojas frescas de muña formulado en enjuague bucal frente al *Streptococcus mutans*.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La caries dental es una de las enfermedades de etiología bacteriana más común entre los seres humanos,⁸ siendo el *Streptococcus mutans*, el microorganismo más importante ligado a tal patología, considerado como la especie más frecuentemente aislada en la placa dentobacteriana.⁶⁰

Los escasos estudios epidemiológicos han señalado que afecta hasta el 90% de la población pero con diferentes grados de intensidad o severidad, por otro lado sólo el 20% de la población lo considera como un problema serio. El mal olor de la boca es un factor negativo para las relaciones interpersonales, pudiendo llegar a producir alteraciones en la conducta de los individuos, tales como aislamiento social, alteraciones psicológicas y aun psiquiátricas, lo que conduce a problemas en el trabajo, en el hogar y en el ambiente amical.

En el año 2012, el porcentaje de atenciones por consultorio externo de la población de la provincia de Huaura fue el 15.21% del total de las atenciones de la DIRESA Lima y siendo la segunda causa de consulta externa en esta provincia las enfermedades de la cavidad bucal, de las glándulas salivales y de los maxilares con 12.78%.²³ **(ANEXO 04)**

En la actualidad existe una gran variedad de agentes antimicrobianos, llamados enjuagues bucales, entre estos está la Clorhexidina al 0,12%, como el agente más utilizado en el medio, dada su eficacia en la eliminación de microorganismos cariogénicos. Sin embargo,

presenta efectos secundarios adversos, como disgeusia y tinción dental, razones que limitan su utilización.²⁵

En consecuencia, existe la necesidad inmediata de trabajar en la prevención y tratamiento de la caries dental y la halitosis a base de productos naturales de fácil implementación y de amplio espectro presentes en extractos de plantas naturales; los cuales podrán estar al alcance de toda la comunidad por su fácil acceso, bajo costo y sobre todo por pocos efectos colaterales indeseables.⁵¹

Por todo lo expuesto, el propósito de la presente investigación fue la preparación de un enjuague bucal de muña, cuyo aceite esencial es un excelente antiséptico frente a las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.2. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1. Delimitación Temporal

El tiempo de estudio corresponde a los meses de Noviembre 2013 a Diciembre del 2014.

1.2.2. Delimitación Geográfica

La recolección de la muestra fue en Tarma - Departamento de Junín (3080 m.s.n.m.) en el mes de Marzo, los ensayos se realizaron en los laboratorios de la Universidad Alas Peruanas y Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

1.2.3. Delimitación Social

Se busca presentar un enjuague bucal que signifique una alternativa de tratamiento, efectivo y económico en la caries dental.

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.3.1. Problema Principal

¿Tendrá efecto antiséptico *in vitro* el enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña frente a la bacteria *Streptococcus mutans*?

1.3.2. Problemas Secundarios

1.3.2.1. ¿Tendrá efecto antiséptico *in vitro* el enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.003% frente a la bacteria *Streptococcus mutans*?

1.3.2.2. ¿Tendrá efecto antiséptico *in vitro* el enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.0015% frente a la bacteria *Streptococcus mutans*?

1.3.2.3. ¿Tendrá efecto antiséptico *in vitro* el enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.00075% frente a la bacteria *Streptococcus mutans*?

1.4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

Determinar el efecto antiséptico *in vitro* del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

1.4.2. Objetivo Específico

1.4.2.1. Determinar el efecto antiséptico *in vitro* del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.003% frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

1.4.2.2. Determinar el efecto antiséptico *in vitro* del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.0015% frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

1.4.2.3. Determinar el efecto antiséptico *in vitro* del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.00075% frente a la bacteria *Streptococcus mutans*..

1.5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1. Hipótesis Principal o Central

El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña presenta efecto antiséptico *in vitro* frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

1.5.2. Hipótesis Secundarias

1.5.2.1. El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.003% presenta efecto antiséptico *in vitro* frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

1.5.2.2. El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.0015% presenta efecto antiséptico *in vitro* frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

1.5.2.3. El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.00075% presenta efecto antiséptico *in vitro* frente a la bacteria *Streptococcus mutans*.

1.6. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La caries dental según reportes del MINSA es considerada la patología bucal con más alta prevalencia en la población peruana, es por ello que con la presente investigación, se buscó evaluar el efecto antiséptico *in vitro* del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Minthostachys mollis* “Muña” frente a *Streptococcus mutans*. El producto natural de esta investigación es la Muña, planta que cada vez es más difundida y conocida, ya que las poblaciones andinas la utilizan como planta curativa para problemas gastrointestinales, además se consume como bebidas e insumos para preparación de comidas.⁶³

En este trabajo se busca innovar nuevas alternativas de enjuagues bucales con principios activos naturales y así permitir posteriormente hacer investigaciones para su uso masivo y que estén al alcance de la población.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Antecedentes Internacionales

Bravo M. y col (2004) ¹¹ en la Universidad Nacional de Catamarca realizó una investigación para estudiar la presencia de Flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Concluyeron que *Minthostachys mollis* si contiene flavonoides y que presenta actividad antibacteriana como consecuencia de la presencia de aquellos.

Güiza D. y Rincón L. (2007) ³⁴ en la Pontificia Universidad Javeriana evaluaron el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” en combinación con inactivación térmica sobre cepas de *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*. No encontrando efecto antibacteriano sobre dichas cepas, atribuyendo esto último a la ausencia de ciertos componentes en la estructura química del aceite.

Mora y col. (2009) ⁴⁸ en la Universidad de los Andes, Mérida - Venezuela examinaron y analizaron los componentes químicos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb var Vaught. Recogidos en enero de 2008 en la localidad de Tuñame, estado

de Trujillo, Venezuela, fueron separados e identificados por el análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas. El aceite esencial se obtiene por hidrodestilación y trece componentes (98,5% de la muestra) fueron identificados por comparación. Los dos componentes principales son pulegona (55,2%) y trans-mentona (31,5%). El aceite esencial mostró un efecto inhibitorio significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (4 µg/ml).

Salazar L. y col. (2009)⁶¹ en la Universidad de La Frontera, Temuco, Chile se realizó un estudio con el objetivo determinar la actividad antimicrobiana in vitro de la miel de abejas sobre los microorganismos cariogénicos estreptococos del grupo mutans. Teniendo como resultado que las concentraciones de miel investigadas (5, 15, 30 y 35%) produjeron inhibición del crecimiento de estreptococos del grupo mutans, en diferentes magnitudes ($p < 0.0001$). Las concentraciones de miel que ocasionaron una mayor reducción del número de unidades formadoras de colonias de estreptococos del grupo mutans fueron 30 y 35% v/v, no existiendo diferencias significativas entre estas dos concentraciones, según el método estadístico de comparaciones múltiples de Duncan.

Antecedentes Nacionales

Fuertes C. y Munguía Y. (2001)²⁸ en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se realizó un estudio comparativo del aceite esencial de *M. mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas: Tarma, Huaraz y Huancavelica (utilizando ensayos físicos, espectro ultravioleta, espectro infrarrojo y composición química), concluyendo que el aceite esencial proveniente de Tarma contenía en su composición 1-Tetradeceno, 2s-Transmetona, Pulegona como componentes principales y un porcentaje importante de Timol, demostrando así que el aceite extraído de ese lugar tiene mejores condiciones que el aceite de los otros dos lugares.

Díaz K. y Moromi H. (2005)²¹, en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos realizó un estudio con el objetivo de determinar la acción antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” enfrentando cepas estándares ATCC de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomicentecomitans* y *Actinomyces sp.* a: Amoxicilina, aceite esencial de *Minthostachys mollis* y agua destilada para medir los halos de acción antimicrobiana encontrándose que *Minthostachys mollis* tiene efectos antimicrobianos sobre las bacterias orales con una media de 16,75 mm de diámetro del halo.

Cano (2007)¹³ en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos realizó un estudio para demostrar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”, proveniente del distrito de Huacrapuquio, provincia de Tarma. Se observó un alto efecto antimicótico frente a cepas de *Cándida albicans* a las concentraciones de 50 y 100 por ciento y dermatofitos *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* sensibles en los volúmenes de 5 y 50mL; encontrándose en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: Pulegona, mentona y limoneno.

Castro A. (2008)¹⁶ en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se realizó un estudio con el objetivo de conocer la composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* donde se identificaron los siguientes componentes químicos: Nona-3,5-dien-2-one, salicilato de metilo, ácido nonanoico, α -longipineno, ácido decanoico, 2-Propenal,3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-yl), α -ciclocitrildeneacetona, trans- β -ionona, olivetol, apiol, ácido hexadecanóico, pitol, ácido linolénico, ácido esteárico. El aceite esencial de coca tiene capacidad antioxidante como donador de electrones o hidrógeno al radical DPPH y como secuestrante del radical superóxido, y presenta actividad prooxidante incrementando la

degradación de la deoxirribosa mediante la adición de iones ferrosos; y también se determinó que el aceite esencial de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) var. Truxillense presenta actividad antibacteriana significativa frente a *Streptococcus mutans*.

Carhuapoma y Col. (2009)¹⁴ en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos se determinó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite esencial se obtuvo por destilación con arrastre de vapor de agua. La actividad antibacteriana se determinó por el método de excavación placa cultivo; resultando en orden de sensibilidad, *Shigella dysenteriae* es la que presenta más sensibilidad al aceite esencial con un promedio de 21,41 mm, seguido de *Helicobacter pylori* con 17,07 mm, *Salmonella typhi* con 14,25 mm y la que menos sensibilidad presentó fue *Pseudomonas aeruginosa* con 11,45 mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para *Helicobacter pylori* se determinó por el método de dilución en microplacas, resultando 2 µg/mL. Para las demás bacterias se determinó por el método de dilución, siendo para *Salmonella dysenteriae* 4 µg/mL, *Salmonella typhi* 4 µg/mL, y *P. aeruginosa* 9 µg/mL de CMI y 10 µg/mL de CMB. Observándose que a mayor concentración es mayor el efecto inhibitorio; es así que la concentración 450 µg/mL produjo en promedio 22,48 mm de halo de inhibición, mientras que para una concentración de 4,5 µg/mL fue de 11,99 mm en la prueba de Duncan. Los porcentajes de inhibición comparados con ciprofloxacino, fueron: *H. pylori* 177,27; *S. dysenteriae* 126,11; *S. typhi* 63,44 y *P. aeruginosa* 42,29 lo que estaría demostrando que el aceite tiene mayor actividad que el ciprofloxacino; esto posiblemente se deba a que los constituyentes del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, como el timol, acetato de timol, metileugenol, pulegona, mentona, limoneno, linalol, entre otros, actúan en sinergismo; y comparado con cloranfenicol: *P. aeruginosa* de 225,56; *S. dysenteriae*

171,97; *S. typhi* 135,95 y *H. pylori* 92,86 a una concentración de 450 µg/mL del aceite esencial.

Fernández K. y Col. (2009)²⁷ en la Universidad Inca Garcilaso de la Vega realizó un estudio con el objetivo de determinar la efectividad antibacteriana in vitro de una solución a base de *Camelia sinensis* “té” al 15% y *Minthostachys mollis* “muña” al 30% frente a flora salival mixta en pacientes ortodónticos del Instituto de Salud del Niño, obteniéndose los siguientes resultados: Las soluciones a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis*, a base de aceite esencial de *Minthostachys mollis*, y la infusión a base de *Camelia sinensis* presentaron todas efectividad antibacteriana con diferencia estadísticamente significativa entre ellas; siendo la primera solución mencionada la que obtuvo mayor efectividad; la segunda, la de mediana efectividad; y la última, la que presentaba menor efectividad entre las tres soluciones.

Malpartida F. (2009)⁴¹ en la Universidad Alas Peruanas realizó un estudio de efecto inhibitor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, el estudio fue *in vitro*. Se concluyó que el gluconato de clorhexidina al 2% posee significativamente mayor efecto inhibitor que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” ($P < 0,05$) y el paramonoclorofenol alcanforado ($P < 0,05$). Además el paramonoclorofenol alcanforado posee significativamente mayor efecto inhibitor que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” ($P < 0,05$). Se concluye que el efecto inhibitor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) es menor que paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% en el cultivo bacteriano de *Enterococcus faecalis* a las 24 y 72 horas.

Paredes N. (2009)⁵⁶ en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos realizó un estudio de determinar la efectividad antibacteriana in vitro de

una infusión a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis* sobre flora salival mixta, recolectando saliva no estimulada de 30 estudiantes universitarios. Utilizó el método de difusión por discos para las soluciones de té verde, muña, clorhexidina y agua destilada. De los resultados obtenidos, concluye que se ha evidenciado la efectividad antibacteriana de una infusión a base de té verde y muña sobre la flora salival mixta, sin embargo, se observó una efectividad antibacteriana menor con respecto a la infusión a base de té verde (por separado), y también menor con respecto a la clorhexidina. Así mismo, también encontró que la media de efectividad del té verde era mayor numéricamente que la clorhexidina pero que no había diferencias significativas entre ambas soluciones.

Azaña I. y col (2010)⁹ en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos realizó un estudio de determinar la efectividad antibacteriana “*in vitro*” del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “muña” frente a bacterias prevalentes en lesiones periapicales crónicas de origen endodóntico, teniendo como resultados que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en sus diluciones del 50% y 25% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a las muestras de conducto radicular con Periodontitis apical crónica, con promedios de halos de inhibición de 11.3mm, 8.8mm y 7.7mm respectivamente, con una significación mayor del 5% ($P < 0.378$). Cualitativamente, frente a la misma muestra, el Aceite esencial puro y las diluciones al 50% y 25% presentaron una efectividad límite; con una significación mayor del 5% ($P < 0.558$), y se concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” 100 % presentó una efectividad antibacteriana, tanto cuantitativamente como cualitativamente mayor, en comparación a las diluciones del 50 % y 25 % frente a las cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular.

Cruzado D. (2012)²⁰ en la Universidad de Trujillo realizó un estudio con el objetivo de conocer *“in vitro”* la concentración inhibitoria mínima del *Minthostachys mollis* “muña” al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans*, obteniéndose los siguientes resultados: el aceite esencial de *Minthostachys mollis* posee efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, a las concentraciones de 50%,75% y 100% y concluyendo que la concentración inhibitoria mínima *in vitro* para el aceite esencial de *Minthostachys mollis*, sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 35668 fue de 50%.

Maraví G. (2012)⁴² en la Universidad Privada Norbert Wiener realizó un estudio con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: *Menta piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028, donde se obtuvieron los siguientes resultados: De los tres aceites esenciales, el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el Orégano, frente a *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans* fue la Hierba Luisa. El aceite esencial de Orégano y Hierba Luisa tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos: Clorhexidina al 0.12% y Nistatina, a excepción de la *Menta piperita* (Menta) al 50% que su acción fue menor que los controles positivos.

Alaba W. (2013)⁴ en la Universidad de Trujillo realizó un estudio con el objetivo determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” y el yoduro de potasio al 2% sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, teniendo como resultado que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en su dilución del 50% presenta efectividad antibacteriana cuantitativamente frente a la cepa *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 8 mm y de 11 mm para el aceite 100% puro, con una significación menor del 5% y se

concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” tienen efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Enfermedades Dentales y Bucales

La cavidad bucal posee una flora bacteriana propia que recubre tanto las mucosas como los dientes. Estos microorganismos constituyen una población rica y compleja, forman un ecosistema que es la placa bacteriana.

La presencia de esta flora bucal no es origen de enfermedad, pero el desequilibrio cualitativo y cuantitativo de este ecosistema es la base de infecciones prevalentes en la población como la caries dental y las enfermedades periodontales.⁶

La boca puede verse afectada por enfermedades localizadas. Es el caso de algunas infecciones y heridas. También las enfermedades sistémicas pueden causar alteraciones en la boca, es el caso de la diabetes, el sida y la leucemia.

Entre los problemas que pueden manifestarse en la boca cabe destacar varios tipos de llagas y tumores, como las aftas y el cáncer. El revestimiento de la boca o del paladar también puede experimentar ciertos cambios de color. Otros problemas consisten en el mal aliento y las enfermedades de las glándulas salivales.⁶

2.2.2. Halitosis

La halitosis, definida como olor desagradable procedente del aliento de una persona, es un problema social asociado frecuentemente a una mala higiene bucal o a enfermedades de la

cavidad oral, pero también puede indicar enfermedades sistémicas severas que necesitan un diagnóstico y tratamiento específicos.²⁶

Tiene una gran prevalencia en la población general, puesto que se estima que más del 50% de las personas la padecen. Casi todo el mundo presenta halitosis al despertar por la mañana, después de varias horas de sueño nocturno, cuando las estructuras de la boca han estado en reposo y la producción de saliva ha sido muy escasa. La mayoría de la población mundial que padecen de halitosis son personas que superan los 50 años de edad.²⁶

2.2.3. Caries dental

La caries dental se define como un proceso patológico infeccioso, localizado, pos eruptivo y transmisible, que termina con la destrucción de los tejidos duros dentales y que se origina como resultado de cuatro factores principales como lo son la microbiota, el sustrato (dieta), el huésped (diente) y el medio ambiente (saliva)⁵⁹. La destrucción del tejido dental esta medida por ácidos que son producto de la fermentación de los carbohidratos de la dieta por parte de los microorganismos de la placa bacteriana¹⁷. Los microorganismos implicados en el proceso de la caries dental están localizados en un biofilm complejo que cubre la superficie del diente, y de acuerdo a su potencial cariogénico, las bacterias que ocupan esta capa pueden ser clasificadas, siendo los Estreptococos, los microorganismos más estrechamente ligados con esta patología, especialmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, aunque también bacterias de tipo *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*, juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad¹⁷.

2.2.4. *Streptococcus mutans*

En 1924, Clarke aisló ciertos microorganismos a partir de caries de dentina a los que llamó estreptococos mutantes, debido a que con la coloración Gram se observaban de forma más ovalada que redondeada, que es la forma típica de los estreptococos, por lo que él consideró que estas bacterias eran mutantes a éste género.⁵⁰

Su principal hábitat es la superficie dentaria del hombre, pero también pueden ser identificados en las fauces. Su presencia en placa bacteriana se ve favorecida por el alto nivel de sacarosa de la dieta.⁵⁰

Desde el punto de vista estructural, no difieren del modelo general de todos los estreptococos, salvo en la ausencia de cápsula, polisacárido C, complejos fibrilares y las fimbrias que cuando existen, no son muy prominentes. Por el contrario, en la pared destacan proteínas dotadas de diversas funciones, y polisacáridos, distintos del C. Estos polisacáridos muestran distintas especificidades antigénicas, lo que permite distinguir los serotipos a, b, c, d, e, f, g y h.⁵⁰

Los *Streptococcus* del grupo mutans son acidogénicos, por lo cual sobreviven y se desarrollan a un pH bajo, y acidúricos o capaces de seguir produciendo ácido en un pH bajo. Estas especies bacterianas consiguen alcanzar rápidamente el pH crítico necesario para iniciar el proceso de desmineralización. El potencial acidogénico acidúrico es importante en su virulencia. Este microorganismo produce ácido láctico a partir de la sacarosa y otros hidratos de carbono con mayor rapidez que otras bacterias bucales. El ácido láctico es fundamental en la virulencia, debido a que es el ácido más potente que interviene en la desmineralización del diente.⁵⁰

2.2.4.1. Clasificación

Los estreptococos del grupo *mutans* son genéticamente heterogéneos y pueden ser divididos en distintos tipos. Esto ha sido posible por medio del estudio de estructuras antigénicas que permiten reconocer hasta 8 serotipos, designados por letras que van de la *a* a la *h*. Esta subdivisión puede ser confirmada por otras investigaciones, tales como el análisis de la pared celular, electroforesis en gel de poliacrilamida o proteínas a partir de células completas, exámenes de las bases de ADN (porcentaje de guanina-citosina) y estudios de hibridación del ADN.⁵⁰

En estos serotipos es posible detectar ciertas diferencias fisiológicas, como fermentación e hidrolización de azúcares. Esto permite suponer que algunos de estos serotipos pueden ser considerados en otras subespecies o especies.

El *Streptococcus mutans* puede ser asimilado por los serotipos c, e, f mientras los restantes han sido ubicados en las siguientes especies:

Streptococcus cricetus (serotipo a)

Streptococcus rattus (serotipo b)

Streptococcus sobrinus (serotipos d y g)

Streptococcus ferus (serotipo c)

Streptococcus macacae (serotipo h)

Streptococcus downei (serotipo h)

Se sabe que estas distintas especies o serotipos varían en diferentes partes del mundo. El serotipo c es común en Europa y América del Norte, mientras que el serotipo b es frecuente en África del Norte. La razón de estas

variaciones se desconoce. Además, no todos los serotipos son igualmente efectivos en la producción de caries dental en animales de laboratorio.⁵⁰

En el grupo del estreptococo mutans, la especie más prevalente en el mundo es la descrita originariamente como *S.mutans* (serotipos c, e y f). Estos microorganismos se encuentran en un nivel del 90% en los portadores de *Streptococcus* del grupo mutans.⁵⁰

La especie *S. sobrinus* (serotipos d y g) aparece con menor frecuencia (entre el 7-35%) en esta población. Las otras especies que comprenden el grupo mutans, *S.rattus*, *S.cricetus*, *S.ferus* y *S.macacae*, muy rara vez han sido aisladas en seres humanos.⁵⁰

Los *S. mutans* pueden sintetizar polímeros extracelulares solubles (dextranos y fructanos) e insolubles (mutanos) a partir de la sacarosa. Los polímeros insolubles desempeñan un papel fundamental en la adhesión del *S. mutans* a la superficie dentaria.⁵⁰

2.2.4.2. Metabolismo de la Sacarosa

El sustrato más importante para estos microorganismos, con respecto a su papel como agente etiológico de la caries, es la sacarosa. De su metabolización deriva la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares.³⁹

En presencia de sacarosa el *S. mutans* produce un glucano extracelular, polímero de la glucosa, que le permite establecerse sobre las superficies dentarias y

formar una placa adhesiva sumamente cariogénica. El *S.mutans* es acidogénico y acidúrico, y éste es el aspecto más importante de su probable potencial cariogénico.³⁹

Sólo una pequeña parte de la sacarosa es derivada para la formación de polisacáridos extra e intracelulares; la mayor parte de ella se emplea como fuente energética para el desarrollo de estos estreptococos.⁵⁰

2.2.4.3. Cultivo

Son anaerobios facultativos. La temperatura óptima de desarrollo es de 36 °C. Aunque pueden multiplicarse al aire, una práctica aconsejable consiste en incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y, posteriormente, otras 24 horas en aerobiosis; esto favorece la formación de agua oxigenada, que es un importante carácter diferencial y, en parte, la síntesis de polisacáridos extracelulares que, en algunos casos, pueden facilitar el reconocimiento de las colonias.³⁹

En agar sangre carnero son alfa y gamma hemolíticos, con excepción de algunas cepas de *S. mutans* que son beta hemolíticas. Como medio poco selectivo puede utilizarse MSA (mitis salivarius agar) que contiene un 5 por 100 de sacarosa y como sustancias inhibitoras, telurito potásico, azul tripán y cristal violeta.

Como medio más selectivo, el usado habitualmente es MSB (mitis salivarius -bacitracina), que es MSA al que se le añade 0,2 U/ml de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100. Este medio está considerado, por

algunos autores como un inhibidor del serotipo a (*S. cricetus*); pese a que esta especie es poco frecuente en la cavidad oral humana.³⁹

Se han desarrollado otros medios de cultivo que no tienen este hipotético inconveniente, como es el caso del agar TYCSB (con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina).³⁹

Las colonias en MSA y MSB miden entre 0.5 – 1.0 mm aparecen elevadas, convexas, onduladas, opacas de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas y con una burbuja de color brillante rodeándolas cuando producen polisacáridos extracelulares.³⁹

Sin embargo, tanto en estos medios como en el Agar TYCSB, el aspecto de las colonias puede variar mucho no sólo entre las especies, sino también entre cepas de la misma especie, este hecho a menudo dificulta su reconocimiento.³⁹

2.2.4.4. Colonización Inicial por *Streptococcus mutans*

En 1980, Berkowitz et al manifestaron que la contaminación de la boca del infante por *S. mutans* ocurre con mayor efectividad después de los 12 meses de edad. Cinco años después, Caufield et al en 1993 informaron que esto ocurre en mayor medida a una edad promedio de 26 meses. Otros autores como Mohan, en 1998 encontraron una mayor colonización de *S. mutans* a partir de los 14 meses de vida; mientras que, Mattos - Granner y col, en el 2001 encontraron en la población brasileña una mayor prevalencia de *S. mutans* en el

70.8% de niños entre 12 y 19 meses de edad, demostrando también que es un factor de riesgo y que de acuerdo con los hábitos, costumbres y grado de contaminación cariogénica de la familia, el riesgo será mayor o menor. Sin embargo, estudios clínicos más recientes han demostrado que los *S. mutans* pueden colonizar la boca de los infantes predestados. Los surcos de la lengua parecen ser el nicho ecológico más importante. Tanner y col utilizando pruebas de ADN reportaron que los *S. mutans* fueron encontrados en 55% de las muestras de placa bacteriana y en el 70% de las muestras de saliva tomadas por medio de un raspado de lengua, en niños entre los 6 y 18 meses. Estos estudios señalan que los *S. mutans* no necesitan una superficie dura en la cavidad oral para su colonización.³⁹

2.2.4.5. Asociación entre Caries dental y *Streptococcus mutans*

La caries dental ha sido definida como un estado dinámico de desmineralización - remineralización que se produce como resultado del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria y que con el avance del tiempo determina la pérdida de mineral y eventualmente, la aparición de una cavidad.³⁹

Numerosos estudios han demostrado que el *S. mutans* está relacionado con la placa cariogénica. En la saliva hay un aumento significativo de estos microorganismos antes de la formación de la caries dental. Debido a su relación con la caries dental, la evaluación de la

concentración de *S. mutans* en placa y saliva puede ayudar al diagnóstico de la actividad de caries.³⁹

Se observa en varios estudios que la prevalencia de caries dental va en aumento con la edad. En los niños menores de 12 meses está por debajo del 10%; asimismo, alrededor de los 36 meses está en el 50%.¹⁰ Cuanto más precoz ocurre la colonización por *S. mutans* mayor es la posibilidad de desarrollo cariogénico. Grindefjord et al en 1995, halló que el riesgo para desarrollar caries dental es 4.3 veces mayor en los infantes colonizados por *S. mutans* en el primer año de vida.³⁹

2.2.5. Enjuague bucal

2.2.5.1. Concepto.

El Enjuague Bucal o “colutorio” estos elixires son soluciones acuosas o hidroalcohólicas que se utiliza después del cepillado de dientes, para eliminar las bacterias causantes de caries y eliminar el aliento desagradable.⁵⁷

2.2.5.2. Importancia

El Enjuague Bucal tiene importancia decisiva en la salud, ya que ayuda a combatir la placa bacteriana y su acumulación en la base de los dientes, el sarro. Además, previene tanto la caries (la acumulación de ácidos que destruyen el esmalte) como la enfermedad periodontal (la retracción de la encía que provoca el debilitamiento del hueso en el que se aloja el diente). Aunque no sustituyen al cepillado, los enjuagues

bucales ayudan a mantener la boca limpia y sana, gracias a su acción antibacteriana.⁵⁷

2.2.6. Antiséptico

Los antisépticos son drogas de acción inespecífica y de uso estrictamente externo, capaces de destruir o inhibir el desarrollo de microorganismos que habitan o se encuentran transitoriamente presentes en la piel o mucosas. Para lograrlo deben reunir suficiente actividad antimicrobiana en el sitio de acción y una buena tolerancia local y general. A altas concentraciones pueden ser tóxicos para los tejidos vivos.

Terapéuticamente hablando, el papel de los antisépticos es el de coadyuvar con los medios naturales de defensa de la piel en el control de los microorganismos patógenos responsables de las infecciones cutáneas primitivas.⁶⁷

2.2.7. Plantas Medicinales

2.2.7.1. Principio activo de Las Plantas Medicinales

Thompson⁶⁶ refiere que el valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química – principio activo – que produce un efecto fisiológico. Mucho de los principios activos son sumamente complejos, desconociéndose aún su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. Por lo general pertenecen a una de estas categorías: aceites esenciales, alcaloides, glúcidos, taninos, sapogeninas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas.

2.2.7.2. Definición

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias volátiles con propiedades aromáticas, extraídos de plantas, en su mayoría por destilación; son generalmente líquidos y rara vez sólidos^{24, 40}. Son el producto final del metabolismo secundario de muchas células vegetales, por lo que no se reintegran al metabolismo celular⁶⁵.

Augusto⁷ define a los aceites esenciales como aquellas sustancias caracterizadas por su volatilidad, formadas por agrupaciones de un gran número de compuestos químicos aromáticos. Existen en las diferentes partes de las plantas, siendo estas sustancias no miscibles en agua. Morales⁴⁹ reporta que la mayoría de las esencias están constituidas por un compuesto predominante; pero que no siempre las características de olor y sabor están dadas por el compuesto principal. Otros componentes en menor traza son importantes y en algunos casos la calidad comercial de ciertas esencias depende de dichos constituyentes.

2.2.7.3. Composición

Se considera que los aceites esenciales son químicamente una mezcla compleja y muy variables de hidrocarburos alicíclicos, denominados terpenos y sus derivados oxigenados llamados alcanfores⁴³. La composición de los aceites esenciales es diversa. Están principalmente constituidos por hidrocarburos de formula $C_{10}H_{16}$. En la actualidad se refieren a un gran número de hidrocarburos que aparecen en la naturaleza con formula (C_5H_8) , sus derivados y compuestos aromáticos^{24, 40}.

Los terpenos por su composición, pueden derivar de la condensación de dos moléculas de Isopreno C_5H_8 . En los mismos aceites esenciales, y en otros productos naturales, aparecen compuestos 25 derivados, análogamente, del Isopreno, de modo que la calificación de terpeno se extiende a todos aquellos, dividiéndolos en hemiterpenos C_5H_8 , terpenos propiamente dichos, sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$, diterpenos $C_{20}H_{32}$ y politerpenos $(C_5H_8)_n$, siendo n un número elevado.^{22,40} Los productos derivados de Isoterpenos que tienen oxígeno reciben el nombre de alcanfores, como ejemplo: en los hidrocarburos terpénicos figuran los limonenos, el mirceno, el pineno. Entre los alcoholes terpénicos más importantes, el geraniol (de las esencias de las rosas), citronelo, etc.^{24, 22}

Y con respecto a sus componentes químicos están constituidos por muchas clases de estos, algunos por un solo componente en un alto porcentaje y otros por mezclas complejas de compuestos cíclicos aromáticos, acíclicos, heterocíclicos y derivados oxigenados.

Los constituyentes principales de los aceites esenciales son:³²

- Hidrocarburos: Mirceno, cinemo, pineno, canfeno, felandreno, bineno, limoneno, cariofileno, geranioleno, santaleno
- Alcoholes: Isoamílico, geraniol, linalol, citronelol, nerodinol, farsenol, terpinol, mentol, borneol, bencílico, fenil-etílico
- Fenoles: Timol, carbacrol, eugenol, vainillina

- Aldehídos: Citral, citronelal, anisaldehído, benzaldehído, cinamadehído
- Cetonas: Alcanfor, carvona, mentona, piperitona, acetato fenona
- Éteres: Anetol, metilchavicol, eucaliptol, ascarodol
- Ésteres: Salicilato de amilo, benzoato de metilo, acetato de terpinilo, acetato de geranilo

2.2.7.4. Propiedades Físicas ²

- Líquidos a temperatura ambiente (a diferencia de los aceites “fijos”).
- Muy raramente son coloreados.
- En general, su densidad es inferior a la del agua.
- Poseen un índice de refracción elevado.
- Desvían la luz polarizada.
- Son liposolubles y solubles en los disolventes orgánicos habituales.
- Arrastrables en vapor de agua (muy poco solubles en ella).
- Punto de ebullición es superior a los 100 °C.

2.2.7.5. Localización de los aceites esenciales en las plantas

Según Miller ⁴⁷ 2000 especies de plantas producen aceites esenciales. Las especies que proporcionan mayor cantidad de aceites esenciales pertenecen a las Familias Labiadas, Umbelíferas Compuestas, Mirtáceas, Laureáceas, Rutáceas y Pináceas. Los aceites esenciales se hallan en regiones circunscritas de la planta como son: raíz, tallos hojas; son segregados por estructuras especializadas como los pelos glandulares, cavidades esquizógenas, etc.

2.2.7.6. Función de los aceites esenciales en la planta

Meyer⁴⁶ informa que no se conoce exactamente la importancia bioquímica que desempeñan los aceites esenciales en las plantas.

Probablemente deben considerarse como productos accesorios del metabolismo, es probable que tengan un papel ecológico. Sin embargo; otros estudios han demostrado que los aceites esenciales regulan la transpiración, especialmente al alterar o modificar la actividad calorífica y la presión osmótica, manifiesta que los aceites esenciales son secreciones patológicas como la resina, el bálsamo, etc., sirviendo a la planta como sustancias protectoras contra las enfermedades de los órganos dañados.⁵⁸

2.2.7.7. Influencia de los factores externos en la producción de aceites esenciales

Diversas investigaciones estudiaron el tipo de influencia de los factores externos y su relación con los aceites esenciales, concluyendo que la luz, el suelo, el clima, la velocidad del viento, etc. determinan su producción.^{66, 58, 19}

2.2.7.8. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los aceites esenciales, compuestos extraídos de varios tipos de plantas y usados para preservar alimentos y bebidas, tienen un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de microorganismos. En su estudio Walton y col. demostró que el extracto destilado del ajo tiene efectos bactericidas y bacteriostáticos.² Se conoce de la actividad antimicrobiana de varias especies

vegetales en forma de extractos o hierbas aromáticas en los alimentos, inhiben la formación vegetativa de esporas, detienen el crecimiento de elementos patógenos y levaduras.²

2.2.7.9. Mecanismo de acción del aceite esencial sobre los microorganismos

Este mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y aún no ha sido del todo entendido y explicado. El modo de acción de los aceites esenciales también dependerá del tipo de microorganismos y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos.¹³ Kakrani y col. establecieron, in vitro, la actividad antimicrobiana, antiparasitaria y antimicótica de los aceites esenciales de *Aglaia odoratissima*. Las investigaciones plantean que los aceites esenciales interferirían la fase del metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción.³⁸

2.2.8. *Minthostachys Mollis*

2.2.8.1 Descripción general

Se denomina en la lengua Quechua “muña”, y en la Aymara tiene 2 nombres: “Coa” y “Huaycha”. Debido a sus características semejantes al pólleo y orégano, los españoles la denominaban poleo silvestre. Otros nombres vulgares con los que se le conoce a esta planta son: "Muña negra", "Polco silvestre", "coz", "muña-muña", "arash muña", "kon" "Orcco-muña".^{10, 64}

La muña, es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3500 m.s.n.m

(metros sobre el nivel del mar).⁶⁴ Habita entre los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, comportándose como tal; existe en gran abundancia. Así como es una planta hemicriptófito que durante la época más fría del invierno y seco desaparecen sus órganos aéreos para brotar nuevamente con las primeras lluvias de la primavera.⁵⁴

Alcanza una altura de 0.80 a 1.50 metros, desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, crece en lugares cercanos a acequias, manantiales sin tener grandes requerimientos de agua.⁴⁹ Se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, bien drenados, con buena retención de humedad, con un pH entre 5-8 y un clima con elevada luminosidad, florece en época de lluvia, se multiplica por semilla y por codo.⁴⁹

2.2.8.2 Clasificación sistemática

Según el sistema de clasificación de J. Mostacero,⁵² la especie de *Minthostachys mollis* “Muña”, se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Methachlamydeae

Orden: Tubiflorae

Familia: Lamiaceae (Labiatae)

Género: *Minthostachys*

Especie: *M. mollis* (Spach) Griseb

Nombre vulgar: “Muña”

2.2.8.3 Características Botánicas

Es una planta arbustiva, leñosa, frondosa en la parte superior, de aspecto general glauco, erecto y pubescente, su tallo es ramificado desde la base. Las hojas es el elemento vegetativo simple ligeramente aserrado, carece de estípulas, cortamente pedunculares de filotaxia opuesta. Su peciolo mide entre 4 y 6 mm. de largo, pubescente acanalada en la parte superior y convexo en la parte inferior, es aquí donde se deposita la mayor cantidad de aceite, que al estrujarlos dejan sentir su aroma característico. Las flores son hermafroditas. El limbo es ovoido 1.7 a 2.5 centímetros. En su mayor ancho, y de 2 a 4 centímetros. de largo; su base es atenuada de bordes aserrados, ápice agudo de nerviación penninervia. El limbo es pubescente tanto en el haz como en el en vez, debido a lo cual las hojas presenta una coloración verde pálida; sus nervaduras secundarias son muy desarrolladas y ligeramente reticuladas. El cáliz soldado con 13 venaciones terminado en 5 lóbulos dentados casi iguales entre sí con pelos en la base, la corola raramente es de 6mm. De largo, dividida en 2 labios: 2 lóbulos o labio superior y 3 lóbulos o labio inferior. Los pelos de las partes aéreas, o sea de las hojas y tallos, parece que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial, de aquí que al estrujarlos dejen sentir su aroma o el sabor picante que da una impresión de frío que es característico. Las flores son pequeñas, reunidas en verticilos falsos, situados en la parte superior de las ramas con pedúnculos cortos, 2 en cada axila.³⁵

2.2.8.4 Tipos de muña

Se indica un total de 12 especies, cuya distribución abarca desde Argentina hasta Venezuela; ⁶⁴ y en el Perú encontraron 6 especies distribuidas desde el norte (Cajamarca) hasta el sur (Cuzco), con una mayor distribución en la región central, cuyas especies son: ^{68,36}

- *M. glabrescens*
- *M. salicifolia*
- *M. cetosa*
- *M. spicata*
- *M. tomentosa*
- *M. mollis (HKB) griseb*

2.2.8.5 Características físico-químicas del aceite esencial de muña^{7, 49}

- Aspecto : Líquida, clara, transparente
- Color : Incoloro
- Olor : Característico en menta
- Sabor : Picante
- Densidad relativa : 0.92
- Índice de refracción : 1.4699
- Índice de mentona : 3.88%
- Índice de menta : 22%
- Índice de acidez : 1.683
- Índice de esteres : 5.819
- Índice de éter : 16.80 %
- Contenido de mentol total: 4.042 %
- Solubilidad en etanol : 95 %

2.2.8.6 Composición Química

Con respecto a la composición química del aceite esencial de *M. mollis* (muña) existen pocos trabajos de investigación por lo que se tiene poca información; el aceite esencial de *M. mollis* (muña), al igual que otros aceites esenciales, presenta una estructura aldehídica, cetónica, alcohólica (mentol y mentona), ésteres, éteres y terpenos en mayor porcentaje.³⁵

Gibaja³⁰ realizó la destemperación del aceite esencial de *M. mollis* (muña) determinando el 10.20% para la parte destemperada (compuestos oxigenados) y 89.80 % para la fracción terpénica. Chica¹⁸ determinó la presencia de carvacril acetato, carvacrol, pulegona y mentona.

2.2.8.7 Moléculas presentes en muña³⁵

2.2.8.7.1. Pulegona

Uno de los componentes más importantes de muchos aceites *Minthostachys*, pero es mejor conocido por pulegium poleo (*Mentha*). Es altamente tóxico en grandes cantidades, daña el hígado y puede provocar el aborto. Su toxicidad probablemente explica algunos de los efectos del aceite de *Minthostachys* contra las plagas y parásitos. La sustancia también se usa en perfumería y saborizantes.

2.2.8.7.2. Mentona

Otro componente muy importante, junto con Pulegona a menudo representa más del 75% de la composición del aceite entero. El más

conocido de la menta (*Mentha piperita*). Tiene un aroma muy agradable sabor a menta y se usa en perfumería, pero también tiene propiedades digestivas.

2.2.8.7.3. Carvacrol

Se han encontrado para ser componentes dominantes en una menor proporción de los estudios de los aceites de *Minthostachys mollis*. Carvacrol también se encuentra en varias hierbas conocidos como el orégano (*Origanum vulgare*), la ajedrea de verano (*Satureja hortensis*) o tomillo (*Thymus serpyllum*), y es sobre todo un valor para sazonar.

2.2.8.7.4. Carvona

Como su nombre lo sugiere, esta sustancia es conocida como un producto de semillas de alcaravea (*Carum carvi*), un Apiaceae. Tiene propiedades digestivas y se utiliza para dar sabor.

2.2.8.7.5. Mentol

Por lo general, mucho menos importante en *Minthostachys mollis*, pero a veces se encuentra como componente menor de la mezcla de aceite. Se utiliza contra dolor de garganta.

2.2.8.7.6. Linalol

Empleado como condimento y como insecticida, linalol es más conocido de cilantro (*Coriandrum sativum*) de la familia Apiaceae. A menudo es

uno de los componentes menores del aceite de *Minthostachys mollis*.

2.2.8.7.7. Timol

Como su nombre lo sugiere, esta sustancia es bien conocida de los aceites de distintas especies de tomillo. Actúa como antiséptico y contra el dolor de garganta y tos. A veces se encuentra como un componente menor en el aceite de *Minthostachys mollis*.⁴⁸

2.2.8.8 Composición nutritiva de muña ³⁵

En 100 gr. De parte comestible

2.2.8.8.1. Componentes mayores

- Agua: 16 ug. %
- Proteínas: 3.20 ug. %
- Grasas: 2.80 ug. %
- Carbohidratos: 66.30 ug. %
- Fibras: 9.40 ug. %
- Cenizas: 11.70 ug. %
- Minerales
- Calcio: 2.24 ug. %
- Fósforo: 269 ug. %
- Hierro: 22.40 ug. %
- Vitaminas
- Retinol: 306 ug. %
- Tiamina: 0.35 ug. %
- Riboflavina: 1.81 ug. %
- Niacina: 6.85 ug. %
- Ac. Ascórbico: 21.10 ug. %

2.2.8.8.2. Otros componentes

- Ácidos débiles: 2.54 ug. %
- Esteres: 14.02 ug. %
- Taninos: Positivos
- Resinas: Positivo
- Fenoles: Positivos
- Alcoholes: Positivo
- Aldehídos: Positivo
- Cetonas: Positivas
- Carbonilo: 22.06 ug. %
- Mentol: 40.42 ug. %

2.2.8.9. Propiedades y usos de la especie *Minthostachys mollis*

La muña es reconocida tradicionalmente por sus propiedades digestivas contra cólicos, flatulencia (carminativo), vómitos, diarreas; antitusígenas, antiasmático, expectorante,^{48,64} antiespasmódicas, antiséptica, analgésico, antiinflamatorio, febrífugas, en tratamiento de tumores y mezclándola con chilca se empleaba en fracturas.⁵³ Es excelente contra la halitosis³ y para combatir jaquecas y soroche. Además es utilizada como condimento para preparar platos típicos.⁴⁸

En el campo agrícola se emplea para la preservación de algunos productos como la papa, del ataque de insectos.^{10, 64, 3}

A manera de fumigante orgánico vegetal contra el gorgojo de los andes y *Norimoschema* y como antimoho⁵³.

En el campo pecuario es utilizado para controlar los ectoparásitos y endoparásitos de los animales domésticos, además para curar sarna en equinos y camélidos.⁴⁸

En otras zonas de Latinoamérica, principalmente en Argentina, se le emplea para aromatizar y fabricar licores y bebidas.⁵⁶

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE LA INVESTIGACIÓN

Experimental, transversal, prospectivo y aplicada.

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El diseño de la investigación fue experimental *in vitro*.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN

3.3.1. Población

Las bacterias que se encuentran en la placa dentobacteriana.

3.3.2. Muestra

La cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

3.4. VARIABLES, DIMENSIONES E INDICADORES

Variable independiente: Concentración del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas de *Minthostachys mollis*.

Variable dependiente: Efecto antiséptico *in vitro* del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas de *Minthostachys mollis*.

| Variable | Dimensiones | Indicadores |
|---|--|---------------------------------|
| Concentración del enjuague bucal | Enjuague bucal del aceite esencial de muña al 0.003% | Aceite esencial puro |
| | Enjuague bucal del aceite esencial de muña al 0.0015% | Aceite esencial al 50% |
| | Enjuague bucal del aceite esencial de muña al 0.00075% | Aceite esencial al 25% |
| Efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal | Prueba de efectividad antibacteriana | Diámetro del Halo de inhibición |

3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1. Técnicas

a. Obtención del aceite esencial de muña

a.1. Recolección de muña

La recolección se realizó a partir de hojas frescas, las cuales se colectaron de la ciudad de Tarma del departamento de Junín (3080 m.s.n.m.) en el mes de Marzo 2014 con permanencia de dos días en dicha ciudad. Las hojas fueron conservadas a temperatura de ambiente sin desecar, y no se expuso al sol ni se lavaron hasta el momento de la extracción del aceite esencial.

Aproximadamente se recolectó entre 10 kilogramos de esta materia prima.

a.2. Marcha Fitoquímica

Preparación del extracto acuoso

Se hizo un extracto acuoso de las hojas de muña por infusión, se secaron las hojas en la estufa a 50°C, luego se procedió a triturar con el mortero, se obtuvo 50 gramos y se colocó en un matraz con 100 ml de agua destilada en estado de ebullición durante 10 minutos. Posteriormente se procedió a filtrar el extracto acuoso con papel filtro.

Se analizó la presencia de posibles metabolitos secundarios en cada una de las soluciones obtenidas siguiendo el método descrito por Look y col. Los compuestos analizados fueron los siguientes: esteroides / triterpenoides, alcaloides, quinonas, flavonoides, taninos, saponinas, lactonas, aminoácidos, glicósidos, resinas y compuestos fenólicos.⁴⁰

El extracto acuoso obtenido fue sometido a la identificación de compuestos químicos presentes en ellas mediante reacciones de coloración y/o de precipitación características, empleando para ello reactivos estandarizados.

- **Ensayo de cloruro férrico:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se añadió acetato de sodio 0.2 M para neutralizar y 3 gotas de una solución tricloruro férrico al 5% en una solución salina fisiológica. Este ensayo positivo permitió reconocer compuestos

fenólicos, resulta positivo con el desarrollo de una coloración rojo-vino.

- **Ensayo de Shinoda:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se adicionó 1 mililitro de ácido clorhídrico concentrado 37% p/p y un trozo de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se esperó 5 minutos, se añadió 1 mililitro de alcohol amílico, se mezcló las fases y se dejó reposar hasta que se separó. Este ensayo permitió reconocer la presencia de flavonoides.

- **Ensayo de Borntrager:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se adicionó 1 mililitro de hidróxido de sodio 10%, 1 mililitro hidróxido de amonio al 5% en agua. Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su separación. El ensayo es positivo para presencia de quinonas cuando la fase alcalina (superior) se colorea de rosado en este caso se reporta (++) o rojo para lo cual se reporta (+++).

- **Ensayo de Dragendorff:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado 37% p/p (calentar suavemente y dejar enfriar hacia la acidez), se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff. La presencia de alcaloides se detecta por la formación de un precipitado naranja rojizo.

- **Ensayo de Espuma:** En un tubo de ensayo se disolvió al extracto acuoso en 10 mililitros de agua destilada; se agitó por 30 segundos. La aparición de espuma por más de 15 minutos luego de la agitación indica la presencia de saponinas en la muestra.

- **Ensayo de Liberman - Buchard:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se añadió el reactivo compuesto por 1 mililitro de Anhídrido acético y 1 mililitro de cloroformo, se dejó resbalar por la pared del tubo de ensayo 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. De ser positiva se producen cambios de coloración (rosa, violeta, azul y verde). Permitted reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y esteroides

- **Ensayo de Sal – Gelatina:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se añadió 1 gramo de gelatina, 100 mililitros de agua destilada y 10 gramos de cloruro de sodio (sal). Un precipitado abundante indica presencia de taninos.

- **Ensayo de Antrona :** A un 1 mililitro del extracto acuoso se dejó resbalar una solución de no más de 24 horas de Antrona al 0.01% en ácido sulfúrico concentrado. La presencia de glicósidos se evidencia por un anillo azul verdoso en la interfase.

- **Ensayo de Ninhidrina:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se añadió 5 gotas de Ninhidrina 1% y se calentó en un baño de agua hirviendo por unos 5 minutos. Una coloración violeta indica presencia de aminoácidos.

- **Ensayo de Hidroxamato Férrico:** A un 1 mililitro del extracto acuoso se añadió una gota de una solución metanólica 2N de clorhidrato de hidroxilamina y una gota de solución metanólica 2N de hidróxido de potasio. La mezcla se calentó a baño de María, y se

aciduló con ácido clorhídrico 0.5N, finalmente se añadió una gota de cloruro férrico al 1%. Se presenta un cambio a color café o violeta cuando se detectan lactonas.

a.3. Extracción del aceite esencial de muña

La obtención del aceite esencial se efectuó con el método por destilación por arrastre de vapor de agua.⁵¹

El método consistió en colocar 10 kilogramos de “Muña” a lo largo del recipiente de metal del equipo extractor de aceite, de tal modo que el material no esté en contacto directo con el agua; luego se calentó hasta el desprendimiento de vapor de agua, a los pocos minutos se observó el paso del vapor de agua conteniendo el aceite esencial a través de los refrigerantes de vidrio, fueron recolectados en una pera de decantación; se dejó en reposo hasta observar la separación del agua y del aceite, se procedió luego a su decantación. El aceite obtenido fue sometido a desecación con sulfato de sodio anhidro; se agitó por 1 minuto y se apreció el agua en forma cristales con el sulfato en la base del tubo. Posteriormente fue filtrado, se separó el aceite y se depositó en un frasco ámbar estéril y se dejó refrigerar.

a.4. Marcha de Solubilidad

En 9 tubos de ensayo se colocó 2 ml del aceite esencial de las hojas de muña y se le agregó a cada uno 2 ml del solvente respectivo: agua, metanol 99%, acetona 99.5%, cloroformo, etanol al 70%, benceno, hexano, acetato de

etilo 0.02M y éter etílico, se agitó y se observaron los resultados.

a.5. Dilución del aceite esencial de muña

Una vez obtenida el aceite esencial de muña, se utilizó este aceite esencial puro y se procedió a realizar diluciones utilizando como solvente el dimetilsulfóxido (DMSO).

- **Concentración al 50 %:** en proporción de 1:1 (en un tubo de ensayo se agregó 1.5 microlitros de aceite esencial de muña con 1.5 microlitros de dimetilsulfóxido).
- **Concentración al 25 %:** en proporción de 1:4 (en un tubo de ensayo se agregó 0.75 microlitros de aceite esencial de muña con 2.25 microlitros dimetilsulfóxido).

El DMSO es un solvente orgánico incoloro e inodoro derivado de la pulpa de la madera, utilizado de forma muy frecuente como excipiente debido a su capacidad de disolver sustancias hidrosolubles como liposolubles, es inerte con muchos principios activos, y se sabe que facilita e incrementa la penetración de la sustancia disuelta y no aumenta su toxicidad. Se usa como disolvente para preparar diferentes concentraciones de aceites esenciales.²⁹

b. Preparación de los enjuagues bucales elaborados a base del aceite esencial de las hojas frescas de muña

Se formuló 100 mililitros del enjuague bucal con el aceite esencial de muña:

| | |
|----------------------|-----------|
| Aceite esencial | 3 μ L |
| Alcohol | 20 mL |
| Cloruro de zinc | 0,42 mg |
| Salicilato de metilo | 0,64 mg |
| Sacarina | 0,1 mg |
| Glicerina | 4.4 mL |
| Azul de metileno | 0,05 mL |
| Colorante | 0.1 mL |
| Agua destilada c.s.p | 100 mL |

Procedimiento

- Se mezcló los ingredientes líquidos (20 ml de alcohol con 4.4ml de glicerina).
- Luego se colocó en un mortero los ingredientes sólidos (0.48mg de cloruro de zinc, 0.64mg de salicilato de metilo con 0.1mg de sacarina).
- Luego se añadió las mezclas de los ingredientes líquidos con los ingredientes sólidos y se agregó el agua destilada hasta llegar a los 100 ml, agitando con una vagueta.
- Se agregó 0.05 ml de azul de metileno y dos gotas colorante, por último se agregó 3 μ l del aceite esencial de las hojas frescas de muña al 25%, 50% y 100% a cada uno de los enjuagues bucales.

Los enjuagues bucales presentaron las siguientes concentraciones:

- Al agregarle 3 μ l aceite esencial al 100% a los 100 ml de enjuague bucal, se obtendría una

concentración final del enjuague bucal del aceite esencial de muña de 0.003%.

- Al agregarle 3 μ l aceite esencial al 50% a los 100 ml de enjuague bucal, se obtendría una concentración final del enjuague bucal del aceite esencial de muña de 0.0015%.
- Al agregarle 3 μ l aceite esencial al 25% a los 100 ml de enjuague bucal, se obtendría una concentración final del enjuague bucal del aceite esencial de muña de 0.00075%.

Los cálculos de las concentraciones de cada uno de los enjuagues bucales elaborados a base del aceite esencial obtenido de las hojas de muña se encuentran en el **ANEXO 05**.

c. Cepa bacteriana

Para el estudio de la actividad antibacteriana del enjuague bucal con el aceite esencial de muña se trabajó con una cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 adquirida en el Instituto Nacional de Salud, del Ministerio de Salud del Perú.

c.1. Reactivación de la cepa bacteriana

Se mantuvo en condiciones de refrigeración normal (2 – 8°C) para viabilizar la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Se sembró el contenido del vial en el medio de TSA (Trypticase Soy Agar), según indicaciones del fabricante. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 37° C durante 5 días.

c.2. Identificación bacteriana de *Streptococcus mutans*

Para lograr la identificación bacteriana se realizó un frotis bacteriano, que consistió en colocar una gota de agua estéril en el centro de un portaobjetos, luego se flameó el asa de siembra y se tomó en condiciones asépticas una pequeña cantidad del cultivo bacteriano y se transfirió a la gota de agua. Se removió la mezcla con el asa de siembra hasta formar una extensión homogénea. Se dejó secar la preparación, se fijó al calor suave y en seguida se realizó la coloración Gram para la identificación bacteriana. Realizado el frotis y fijadas las bacterias, se realizó el examen microscópico determinando así la forma y el Gram de la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans*.

d. Prueba de efectividad antibacteriana

d.1. Estandarización de la cepa aislada de *Streptococcus mutans*

Se estandarizó la cepa bacteriana según la escala de Mc Farland 0.5, para la cual se extrajeron con un asa de siembra de tres a cuatro colonias de la cepa reactivada de *Streptococcus mutans* y se inocularon en 5 ml de suero fisiológico al 0.9 %, se agitó el tubo por 5 minutos, se observó la misma turbidez de la escala de Mc Farland al 0.5. Bajo condiciones estériles se procedió a sembrar con un hisopo el inóculo bacteriano en placas que contenían Agar TSA. Las placas se dejaron reposar unos minutos antes de proceder a colocar los discos.

d.2. Difusión en agar con discos

Se utilizó discos de papel filtro de 5 mm de diámetro previamente esterilizados.

Con una pinza estéril se procedió a colocar en una placa 1 disco de papel filtro embebido con 10 µl del enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.003%, 1 disco de papel filtro embebido con 10 µl del enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.0015%, 1 disco de papel filtro embebido con 10 µl del enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.00075% y 1 disco de papel filtro con 10 µl de dimetilsulfóxido (control negativo). Las diez placas se incubaron por 48 horas a 37°C.

e. Recolección de datos

e.1. Medición del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano

Para la medición de los halos de inhibición se utilizó un vernier previamente calibrado, con el fin de minimizar errores.

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición incluyendo el diámetro del disco embebido.

f. Procesamiento de los resultados

El análisis de datos se realizó por el programa SPSS versión 20.0 aplicando pruebas de homogeneidad de varianza (Prueba de Leveane), ANNOVA one way o de un factor y a la

prueba estadística Post hoc de Tukey al 95% de nivel de confianza y 5% de error relativo.

3.5.2. Instrumentos

Se registraron los diámetros de halos de inhibición en la ficha de recolección de datos. **(ANEXO 01)**

3.6. PROCEDIMIENTOS

Procedimientos descritos en cada técnica antes detallados.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. RESULTADOS

Se obtuvo un rendimiento del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña de 0.54 por ciento v/p. (**ANEXO 16**)

Tabla N° 01: Resultados de la descripción organoléptica del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña

| Descripción | Resultado |
|--------------------|-----------------------------|
| Color | Ligeramente amarillento |
| Olor | Agradable similar al mentol |
| Aspecto | Líquido denso |
| Sabor | Picante |

Tabla N° 02: Marcha fitoquímica del extracto acuoso de las hojas de muña

| Metabolitos | Ensayo | Presencia |
|---------------------------|---------------------|------------------|
| Compuestos Fenólicos | Cloruro Férrico | +++ |
| Flavonoides | Shinoda | +++ |
| Quinonas | Borntrager | - |
| Taninos | Sal - gelatina | - |
| Alcaloides | Dragendorff | - |
| Saponinas | Espuma | ++ |
| Esteroides/Triterpenoides | Liberman - Buchard | + |
| Glicósidos | Antrona | ++ |
| Aminoácidos | Ninhidrina | + |
| Lactonas | Hidroxamato férrico | + |

En base a reacciones de coloración y/o precipitación, clasificadas como:

Abundante: +++

Moderado: ++

Escaso: +

Negativo: -

Tabla N° 03: Marcha de solubilidad del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña

| Solventes | Resultados |
|------------------|-------------------|
| Agua | - |
| Metanol | ++ |
| Etanol 70% | ++ |
| Acetona | ++ |
| Acetato de Etilo | ++ |
| Éter Etílico | +++ |
| Cloroformo | +++ |
| n - hexano | ++ |
| Benceno | +++ |

Muy miscible (+++) poco miscible (++) no miscible (-)

Tabla N° 04: Resultados de la descripción organoléptica de los tres enjuagues bucales elaborados a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña

| Descripción | Resultado |
|--------------------|------------------|
| Color | Celeste |
| Olor | Menta |
| Aspecto | Líquido |
| Sabor | Menta |

Tabla N° 05: Diámetros de los halos de inhibición de cada enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña

| Placa | Enjuague bucal de aceite esencial de muña 0.003% (mm) | Enjuague bucal de aceite esencial de muña 0.0015% (mm) | Enjuague bucal de aceite esencial de muña 0.00075% (mm) | DMSO (dimetilsulfóxido) (mm) |
|-------|---|--|---|------------------------------|
| 1 | 9.54 | 6.45 | 5 | 5 |
| 2 | 11.52 | 6.44 | 5 | 5 |
| 3 | 12.56 | 7.29 | 5 | 5 |
| 4 | 10.91 | 7.01 | 5 | 5 |
| 5 | 11.65 | 7.44 | 5 | 5 |
| 6 | 11.53 | 8.43 | 5 | 5 |
| 7 | 10.88 | 7.40 | 5 | 5 |
| 8 | 9.77 | 8.41 | 5 | 5 |
| 9 | 12.22 | 7.68 | 5 | 5 |
| 10 | 12.7 | 6.89 | 5 | 5 |

Los valores de halos de inhibición incluyen tamaño de discos 5 mm

Tabla N°06: Estadística descriptiva según los halos de inhibición obtenidos de la aplicación de los tratamientos respectivos

**Descriptivos
HALOS**

| | N | Media | Desviación típica | Error típico | Intervalo de confianza para la media al 95% | | Mínimo | Máximo |
|-------|----|----------|----------------------|--------------|--|-----------------|--------|--------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| | | | | | 1 | 10 | | |
| 2 | 10 | 5,00000 | ,000000 | ,000000 | 5,00000 | 5,00000 | 5,000 | 5,000 |
| 3 | 10 | 7,34400 | ,697459 | ,220556 | 6,84507 | 7,84293 | 6,440 | 8,430 |
| 4 | 10 | 11,32800 | 1,073776 | ,339558 | 10,55987 | 12,09613 | 9,540 | 12,700 |
| Total | 40 | 7,16800 | 2,689606 | ,425264 | 6,30782 | 8,02818 | 5,000 | 12,700 |

Dónde:

- 1 = Control Negativo (Dimetilsulfóxido)
- 2 = Enjuague Bucal al 0.00075%
- 3 = Enjuague Bucal al 0.0015%
- 4 = Enjuague Bucal al 0.003%

En el cuadro adjunto podemos observar la aplicación de la estadísticas descriptivas a los datos obtenidos, todas las medias se encuentran dentro de los límites establecidos a un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 5% por ello ningún dato se excluye y por ende se aplicó estadística inferencial para determinar si existen diferencias significativas de las medias de cada tratamiento aplicado.

Tabla N° 07: Prueba de homogeneidad de varianzas según los halos de inhibición obtenidos de la aplicación de los tratamientos respectivos

| HALOS | | | |
|-----------------------|-----|-----|------|
| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| 12,785 | 3 | 36 | ,000 |

Dónde:

H_0 = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos ($P < 0.05$)

H_1 = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos ($P > 0.05$)

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. Observamos que $p < 0.05$, por lo tanto se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, aceptando la hipótesis nula. Es importante el resultado ya que esto nos permite elegir la prueba estadística inferencial correspondiente que en este caso fue la prueba ANNOVA One Way o de un factor.

Tabla N°08: ANNOVA de un factor según los halos de inhibición obtenidos de la aplicación de los tratamientos respectivos

| HALOS | | | | | |
|--------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Inter-grupos | 267,370 | 3 | 89,123 | 217,448 | ,000 |
| Intra-grupos | 14,755 | 36 | ,410 | | |
| Total | 282,125 | 39 | | | |

DONDE:

H_0 = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($P > 0.05$)

H_1 = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($P < 0.05$)

La prueba ANNOVA One Way nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado ($P < 0.05$) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Si deseamos determinar que medias son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicó la prueba de TUKEY ya que es la más usada por los estadistas.

Tabla N° 09: Comparaciones múltiples según los halos de inhibición obtenidos de la aplicación de los tratamientos respectivos

VARIABLE DEPENDIENTE: HALOS
HSD DE TUKEY

| (I) Halo | (J) Halo | Diferencia de medias (I-J) | Error típico | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
|----------|----------|----------------------------|--------------|-------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1 | 2 | ,000000 | ,286308 | 1,000 | -,77109 | ,77109 |
| | 3 | -2,344000* | ,286308 | ,000 | -3,11509 | -1,57291 |
| | 4 | -6,328000* | ,286308 | ,000 | -7,09909 | -5,55691 |
| 2 | 1 | ,000000 | ,286308 | 1,000 | -,77109 | ,77109 |
| | 3 | -2,344000* | ,286308 | ,000 | -3,11509 | -1,57291 |
| | 4 | -6,328000* | ,286308 | ,000 | -7,09909 | -5,55691 |
| 3 | 1 | 2,344000* | ,286308 | ,000 | 1,57291 | 3,11509 |
| | 2 | 2,344000* | ,286308 | ,000 | 1,57291 | 3,11509 |
| | 4 | -3,984000* | ,286308 | ,000 | -4,75509 | -3,21291 |
| 4 | 1 | 6,328000* | ,286308 | ,000 | 5,55691 | 7,09909 |
| | 2 | 6,328000* | ,286308 | ,000 | 5,55691 | 7,09909 |
| | 3 | 3,984000* | ,286308 | ,000 | 3,21291 | 4,75509 |

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Dónde:

- 1 = Control Negativo (Dimetilsulfóxido)
- 2 = Enjuague Bucal al 0.00075%
- 3 = Enjuague Bucal al 0.0015%
- 4 = Enjuague Bucal al 0.003%

La prueba de TUKEY es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son estadísticamente homogéneas. En el cuadro adjunto observamos que existen diferencias significativas entre los tratamientos 1, 2, 3 y 4. Por ello se debe aplicar la prueba de Subconjuntos de TUKEY para identificar las diferencias antes mencionadas.

Tabla N° 10: Subconjuntos homogéneos según los halos de inhibición obtenidos de la aplicación de los tratamientos respectivos

**HALOS
HSD de TUKEY**

| CATEGORI A | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|---------------|----|------------------------------|----------|-----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 4 | 10 | 5,000000 | | |
| 3 | 10 | 5,000000 | | |
| 2 | 10 | | 7,344000 | |
| 1 | 10 | | | 11,328000 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

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

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10,000.

La prueba de TUKEY permite también determinar los tratamientos que son estadísticamente homogéneos. En el cuadro adjunto se observa que los tratamientos 3 y 4 presentan medias homogéneas a diferencia de los tratamientos 1 y 2, por ende se puede describir que el enjuague bucal al 0.003% elaborado a base del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "MUÑA" presenta el mejor efecto antiséptico seguido del enjuague bucal al 0.0015%.

4.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La presente investigación de tipo experimental “*in vitro*”, tuvo como propósito determinar el efecto antiséptico del enjuague bucal elaborado del aceite esencial de muña frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175, utilizando tres concentraciones del aceite esencial (25%, 50% y 100%).

Las hojas de *Minthostachys mollis* “muña” fue recolectado en el distrito de Huagapo ubicado en la provincia de Tarma, se tomó en cuenta estudios de Fuertes-Munguía²⁸ y Cano¹² de *Minthostachys mollis* por poseer mejores propiedades físico-químicas, lo que nos indicaría que el aceite esencial presenta mejores condiciones para este estudio.

El aceite esencial de muña fue una sustancia oleosa, color ámbar, producto de la destilación de la planta (hojas) mediante el método arrastre vapor de agua, el efecto antibacteriano del aceite esencial de muña, coincide con estudios de González³³ quien concluyó que el aceite esencial de muña presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus mutans*, siendo la CMI de 0.31 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y la CMB, de 0.62 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a 0.75 $\mu\text{L}/\text{mL}$; De Alcalá⁵ concluyó que el aceite esencial de las hojas de muña (al 100 %) tuvo mayor efecto contra la *Candida albicans* que el Fluconazol; además, el efecto antimicótico del Fluconazol fue mayor que la *Minthostachys mollis* al 25%, y fue el mismo que la *Minthostachys mollis* al 50%; Castillo¹⁵ concluyó que el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling “Muña” al 50 % y 100 % presentan actividad antibacteriana frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 255586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277; según Azaña⁹ el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” 100 % presentó una efectividad antibacteriana mayor en comparación a las diluciones del 50 % y 25% frente a las cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular; Carhuapoma¹⁴ concluyó que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*,

Salmonella typhi y *Pseudomonas aeruginosa* es mayor que el ciprofloxacino y que se debería posiblemente a los componentes del aceite esencial; Mora⁴⁸ determinó dos componentes principales son: pulegona (55.2 %) y trans-mentona (31.5 %). El aceite esencial mostró efecto inhibidor significativo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), especialmente *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* (4 ug/ml); Cano¹³ observó un alto efecto antimicótico frente a las cepas de *Cándida albicans*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagophys*, *Microporuncanis* a las concentraciones de 50 % y 100 % y encontró en el aceite esencial los siguientes componentes químicos: pulegona, mentona y limoneno; Díaz²¹ trabajó con cepas de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Actinomyces sp.* Encontrando que la bacteria más sensible fue *Fusobacterium nucleatum*, seguida del *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* con un promedio de 16.5 mm de halo de inhibición, refiere que la propiedad antimicrobiana se debería a las sustancias terpenoides presentes en el aceite esencial de *Minthostachys mollis*; Inga³⁵ demostró propiedades bactericidas/bacteriostáticas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *B. cereus* MC, *Salmonella typhi*, *S. sonnei* MC, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *K. pneumoniae* ATCC 10031; en contraposición de Güiza³⁴, Salmón⁶² y Palacios⁵⁵ no encontraron actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña”; Paredes⁵⁶ utilizó infusiones de muña combinada con té verde donde su efecto antibacteriano en bacterias de flora salival mixta fue menor que la infusión de té verde puro.

El aceite esencial al 50% y 25% fueron sometidos a un proceso de dilución para obtener dichas concentraciones y se diluyeron con DMSO; por ello se explica la disminución del efecto antiséptico ya que presenta menor concentración de los compuestos químicos presentes en el aceite esencial, es importante resaltar que al ser sometido a menores concentraciones serán menos efectivos o no presentaran halos de inhibición, y se usó como control negativo para corroborar que no interfiera en el crecimiento

bacteriano; se tomó en cuenta estudios de Maraví⁴² que diluyó el aceite esencial de menta, orégano y hierba luisa con DMSO para llegar a las concentraciones 50%; Carhuapoma¹⁴ diluyó el aceite esencial de *Satureja brevicalyx* en DMSO a las concentraciones de 10, 20, 30, 50 µg/ml; Abad¹ diluyó el aceite esencial de *Piper pubinervulum* a 6 concentraciones (50, 20, 10, 5, 2, 1%); y también lo usaron como control negativo en sus respectivos estudios, al igual que Calderón¹² cuando analizó del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*.

En la presente investigación se trabajó con cepa estándar de *Streptococcus mutans* principal bacteria implicada en el proceso de caries dental coincidente con Díaz²¹, González³³ y Maraví⁴². En la prueba de susceptibilidad con las diluciones del aceite esencial de *Minthostachys mollis* se empleó el método de Difusión, estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados Unidos en 1966, se demuestra la gran utilidad de los ensayos in vitro, el cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de sustancias activas en un medio sólido y posteriormente se evidencia por la formación de halos claros.^{18, 53}

Se empleó el método de difusión en Agar TSA con disco que contenían las distintas concentraciones de los enjuagues bucales del aceite esencial *Minthostachys mollis* con el objetivo de comparar el efecto antibacteriano en la cepa de *Streptococcus mutans*, a diferencia de las investigaciones previas de Bravo y col.¹¹ que emplearon el método de difusión en agar con perforaciones para estudiar la presencia de Flavonoides en *Minthostachys mollis* “muña” y *Lepechinia millerii* (Walp) Epling y la actividad antimicrobiana de sus extractos frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Investigaciones como las de Díaz²¹, Cano¹³, Güiza – Rincón³⁴ y Mora⁴⁸ avalan el buen funcionamiento del método Difusión en agar con disco en trabajos similares de *Minthostachys mollis*.

En esta investigación; el enjuague bucal elaborado del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.003%, enfrentado con cepas de *Streptococcus mutans* presentó halos de inhibición promedio 11.328 mm de mayor diámetro en comparación con el enjuague bucal elaborado del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.0015% cuyo promedio fue 7.344 mm y al 0.00075% no presentó halos de inhibición; de las tres sustancias estudiadas, el que obtuvo mayor diámetro de halo de inhibición fue el enjuague bucal de aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.003%.

En cuanto al mecanismo de acción del aceite esencial de las hojas de muña, se fundamenta en: la destrucción de la pared del microorganismo y la membrana citoplasmática los cuales resultan en el rompimiento de la membrana y coagulación del citoplasma.^{37, 31}

Existen pues una razón primordial para que el análisis de la composición y bioactividad del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis*, debe ser estudiado e investigado intensivamente en la actualidad, debido a que las drogas obtenida por síntesis química, así como los conservadores son considerados carcinogénicos y teratogénicos.⁴⁵

En la presente investigación se observa, en todos los casos, que el efecto antiséptico de tipo cuantitativa del aceite esencial *Minthostachys mollis* es directamente proporcional a la concentración del aceite esencial en la dilución, esto coincide con el trabajo de Azaña⁹ que estudiaron la actividad antimicrobiana de *Minthostachys mollis* frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y muestras de conducto radicular hallando una relación directamente proporcional entre la concentración y el tamaño de la inhibición, al igual que Chica y col¹⁸ que estudiaron la actividad antimicrobiana de *M. mollis* frente a bacterias patógenas propias de la papa hallando la misma conclusión; Alcalá⁵ que trabajó con *Candida albicans* comparó el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100%,

50% y 25% con Fluconazol, concluyendo que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % presentó mayor efecto antifúngico comparado con las diluciones del 50%, 25% y Fluconazol representado cuantitativamente por la medición de halos de inhibición.

De esta manera, el estudio por lo antes expuesto lleva a aceptar la hipótesis general propuesta, al inicio de la investigación, pudiendo afirmar que el enjuague bucal al 0.003% y al 0.0015% elaborado a base del aceite esencial obtenido de hojas frescas de muña tienen un efecto antiséptico *in vitro* frente al *Streptococcus mutans*; pero observando la significancia estadística a un nivel de confianza del 95% y un error relativo del 5%, el enjuague bucal de aceite esencial de muña 0.00075% y el control negativo (DMSO) presentan medias homogéneas a diferencia de los enjuagues bucales de aceite esencial de muña 0.003%, 0.0015%.

CONCLUSIONES

- Se logró determinar el efecto antiséptico *in vitro* del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de *Minthostachys mollis* a concentraciones de 0.003% y 0.0015% frente *Streptococcus mutans*, siendo la concentración de 0.003% la que presentó mayor efecto antiséptico con un promedio de 11.328 milímetros, comparado con los otros enjuagues bucales al 0.0015% y 0.00075%.
- El enjuague bucal formulado con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.003% presentó mayor halo de inhibición promedio de 11.328 milímetros, comparado con el enjuague bucal formulado con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.0015% cuyo promedio fue 7.344 milímetros y según la prueba de TUKEY se observó diferencias significativas entre ambos a un nivel de confianza del 95% y un error relativo del 5%, indicando que el enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.0015% presenta menor efecto antiséptico *in vitro* comparado con el enjuague bucal del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.003%.
- El control negativo (dimetilsulfóxido) y el enjuague bucal formulado con el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 0.00075% no obtuvieron halo de inhibición.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios posteriores *in vivo* para comprobar su eficacia y aplicación futura en el campo de la salud.
- Comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), frente a diferentes fármacos utilizados en la cavidad bucal
- Realizar estudios posteriores con las otras especies de *Minthostachys*.
- Realizar estudios posteriores para identificar el principio activo que ejerce efecto antimicrobiano en el aceite esencial de *Minthostachys mollis*.
- Realizar trabajos posteriores con mayor cantidad de ensayos, así como también con otras bacterias de interés clínico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abad J. y Cabezas D. Estudios de la actividad antioxidante y antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Piper pubimervulum* [Tesis]. Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana; 2014.
2. Agapito T. y Sung I. Fitomedicina 1100 Plantas Medicinales. 1a edición. Lima: Editorial IRL; 2003.
3. Agencia de cooperación técnica del Perú (ACT) del Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: Perspectivas de desarrollo en la región Los Libertadores Wari (curso regional). Ayacucho: 1999; 237 – 246.
4. Alaba W. Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
5. Alcalá-Marcos Katherine M, Alvarado-Gamarra A. Giancarlo, Alejandro Paredes L Arturo, Huayané-Linares Eduardo. Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el Fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. CIMEL. 2011; 16 (2): 83-86
6. Álvarez M. Tratamiento de las enfermedades de la cavidad bucal. Farmacoterapia. OFFARM. 2003; 22: 80-86.
7. Augusto W. Fraccionamiento del aceite esencial de *M. Mollis* (muña) y su aplicación en la inhibición del brotamiento de papa cultivar mariva. Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNALM; 1975.
8. Aricapa D, Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. [Tesis]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
9. Azaña I. Efectividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2010.

10. Bardales A, Yarlequé M, Rueda L. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de *Minthostachys mollis* "Muña". I Congreso Internacional de Biología - XIII Congreso Nacional de Biología- VII Simposium de Educación en Ciencias Biológicas. Lima: Perú; 1999.
11. Bravo O, Hernández E, Tereschuk L, Romero A, Abdala R. *Minthostachys mollis* griseby Lepechinia meyenii walp epling: actividad antimicrobiana de sus extractos, determinaciones preliminares de sus flavonoides mayoritarios. Revista del CIZAS. 2004; 5(1 y 2): 7-23.
12. Calderón D, Guerrero A. Análisis del efecto antibacterial de aceites esenciales de *Lepechinia rufocampii* y *Minthostachys tomentosa* sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*. [Tesis]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2013.
13. Cano C. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). [Tesis]. Lima: UNMSM; 2007.
14. Carhuapoma M. y col. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb "ruyaq muña. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2009.
15. Castillo D. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Satureja brevicalex* Epling "Muña" al 50 y 100 % comparado con Clorhexidina al 0.2 % frente a cepas de *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. [Tesis]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2010.
16. Castro A. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2008.
17. Chaves, M., Gómez, S. & Martínez, M. Microorganismos asociados al desarrollo de la caries. Univers Odont. 2000; 20 (Supl 1): 33-42.
18. Chica N, Sánchez J, Carrascal K, Melgarejo M. Antimicrobial activity of *Minthostachys mollis* (Lamiaceae) essential oil. APS Caribbean Division 2007; 97(7) (Suppl).

19. Chobanu L. Variability of the composition of terpenoids for *Mentha longifolia* sp. *Caucasica* Brig. In ontogénesis. *Mater RespKon. Fiziol Bokhim* 1976: 262-271.
20. Cruzado J. Concentración inhibitoria mínima in vitro del *Minthostachys mollis* (muña) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 35668. [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2012.
21. Díaz K., Moromi N. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2005.8 (2):3 – 5.
22. Diccionario de botánica” Editorial labor S.A. Barcelona – España.1979.
23. Diresalima.gob.pe [Internet]. Huaura – Lima: Diresa Lima; 2013 [Actualizado 04 Dic 2013; Citado 23 Jul 2014]. Disponible en: <http://www.diresalima.gob.pe>.
24. Duraffourd C, D’ hervicourt L, La praz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1° edición. París: editorial Masson SA; 1983.
25. Eguizábal M, Moromi H. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*, *Rev Odontol Sanmarquina*. 2007; 10(2):18-20.
26. Fernández J, Rosanes R. Halitosis: diagnóstico y tratamiento en atención primaria. *MEDIFAM* 2002; 12:46-57.
27. Fernández K. Efectividad antibacteriana in vitro de una solución a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis* frente a flora salival mixta en pacientes ortodónticos. [Tesis]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2009.
28. Fuertes C y Munguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación* 2001; IV (1): 23-39.
29. Gaylord Chemical Company L.L.C. Dimetilsulfóxido. Boletín N° 101. Estados Unidos; 2007.
30. Gibaja S. Investigaciones químicas de la muña *M. mollis*. [Tesis]. Lima: UNMSM; 1960.

31. Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 6a edición. México: Interamericana; 1985
32. Goldsmith J. Thorpe's Dictionary of applied Chemistry. 10a Edición. Londres: Editorial Sir Ian Heilbron; 1967: 658.
33. González Cabezas, J.; Asmat Abanto, A; Saavedra Urteaga, C. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis]. Trujillo: UPAO; 2013.
34. Güiza D y Rincón L. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. [Tesis]. Bogotá: PUJ; 2007.
35. Inga A y Guerra B. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2000.
36. Jaroslav S. Vocabulario de los nombres vulgares de la Flora Peruana. 1a edición. Lima: Editorial Salesiana; 1970.
37. Kalemba D. and Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils Current Medicinal Chemistry. Poland: Technical University of Lodz; 2003: 813-829.
38. Kakrani K, Nai V. Antibacterial and antifungal activity of volatile oil from the seeds of *Aglaiaodoratissima*. *Fitoterapia* 1982; 53: 107-109.
39. Liébana J. Microbiología Oral. 1a edición. España: Editorial Interamericana Mc. Graw Hill; 1995: 227- 32, 447-62.
40. Look de Ugaz, O "Investigación fotoquímica". Métodos en el estudio de productos naturales. 1a edición. Lima: Fondo editorial; 1988.
41. Malpartida F. Efecto inhibitor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. [Tesis]. Lima: UAP; 2010.
42. Maraví G. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: *Menta piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175,

- Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028. [Tesis]. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener; 2012.
43. Marques AMC. Estudo comparativo da actividade de antimicrobiana de soluções irrigadoras à base de Clorexidina em diferentes concentrações sobre microorganismos frequentemente encontrados no canal radicular. Estudo in vitro. [Dissertação]. Universidade Federal da Bahia Salvador; 1997.
 44. Mendoza O. Evaluación de dos enjuagatorios bucales en la reducción del número de colonias del género estreptococos, a los 5 minutos de su aplicación. [Tesis]. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2003.
 45. Mesa AC, Bueno JG, Betancur LA, Productos naturales con actividad antimicrobiana. Rev. Esp. Quimioterap. 2004; 27 (4): 325-331
 46. Meyer L. Introducción a la Fisiología Vegetal. 3a Edición. Buenos Aires: Editorial EUDEBA; 1970: 272.
 47. Miller E. Fisiología Vegetal. 1a Edición. México D.F.: Editorial Centro Regional de Ayuda Técnica; 1967: 111-114.
 48. Mora F. et al. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Minthostachys mollis* from Venezuelan Andes. Natural Product Communications. 2009; 4(7): 997-1000.
 49. Morales A. Estudio de la extracción y características de los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y de *S. Sagittata* (hierba buena). [Tesis]. Lima: UNALM; 1973.
 50. Moromi H. Manual de prácticas de microbiología general y estomatológica. Lima, Perú 2002: 92-101.
 51. Moromi N., Martínez C., Villavicencio G., Burga S. y Ramos P. Efecto antimicrobiano in vitro de la *Camelia sinensis* sobre bacterias orales, Odontología Sanmarquina 2007; 10 (1): 18-20.
 52. Mostacero LJ, Mejía CF, Gamarra TO. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Edit. CONCYTEC. Trujillo; 2002.
 53. Oblitas E. Plantas medicinales en Bolivia: farmacopea Callawaya. 2a Edición. La Paz: Editorial los amigos del libro; 1998: 8.
 54. Oviedo F. Ensayos toxicológicos preliminares con aceite esencial de 'muña'. [Tesis]. Cuzco: UNSAAC; 1979.

55. Palacios E, Mendoza A, Salcedo D. Efecto bactericida in vitro de *Minthostachys mollis* (muña) frente a *Streptococcus* orales. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2004
56. Paredes N. Efectividad antibacteriana in vitro de una infusión a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis* sobre flora salival mixta. [Tesis]. Lima: UNMSM; 2009.
57. Parr, A. Tecnología Farmacéutica. 2a edición. Zaragoza: Editorial Acribia; 2001.
58. Ricse C. Contribución al estudio de la esencia de *Minthostachys setosa* epling. [Tesis]. Lima: UNMSM; 1962
59. Rodríguez, A. & González, O. Fisiopatología de la caries dental. *Univers Odont.* 2000; 20(Supl 1): 21-27.
60. Romero M, Hernández Y, Gil M, Actividad inhibitoria de la matricaria recutita "manzanilla alemana" sobre el *Streptococcus mutans*. *Rev. Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría.* [Internet]. [acceso 20 Jun 14]. Disponible en:
<https://www.ortodoncia.ws/publicaciones/2009/art1.asp>
61. Salazar, L. A.; Medina, F.; Donoso, F.; Barrientos, L. & Sanhueza, A. Acción antimicrobiana in vitro de la miel de abejas sobre los microorganismos cariogénicos estreptococos del grupo mutans. *Int. J. Morphol.* 2009; 27(1):77-82.
62. Salmón L. Contribución al estudio de la especie vegetal *Minthostachys mollis* KuntGriseb "Muña" en los aspectos fitoquímico, toxicológico, antimicrobiano y bromatológico. [Tesis]. Lima; 1994. 5-15.
63. Salud Bucal. [Internet]. Perú: MINSA [acceso 19 de junio de 2013]. Disponible en: http://www.minsa.gob.pe/portada/est_san/saludbucal.htm
64. Sotta N. Plantas aromáticas y medicinales de la. región Arequipa. 1a edición. Arequipa: Editorial Akuaella; 2000: 99-100.
65. Strasburger E, Noll E, Schenk H. Tratado de Botánica. 7a edición. España: Editorial Marín; 1978.
66. Thompson W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1a Edición. Barcelona: Editorial Blume; 1981: 119.
67. Vives E. y col. Antisépticos y desinfectantes. *Farmacología II*; 2004

68. Weberbauer M. El mundo vegetal de los Andes Peruanos. 1° edición. Lima: Editorial Lumen S.A.; 1945.
69. Wikipedia. [Internet]. Enjuague Bucal; Modificado 7 abr 2014; Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Enjuague_bucal.
70. Zuñiga S. Elaboración y ensayo in-vivo de enjuagues bucales a partir de extractos de Sábila, Perejil, Canela, Clavo de olor a diferentes concentraciones. [Tesis]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011.

ANEXOS

ANEXO 01: Instrumento de recolección de datos

Medición del halo de inhibición en milímetros

Cuadro: Aplicación del enjuague bucal del aceite esencial de muña 0.003%, 0.0015% y 0.00075%

| Placa | Enjuague bucal de aceite esencial de muña 0.003% (mm) | Enjuague bucal de aceite esencial de muña 0.0015% (mm) | Enjuague bucal de aceite esencial de muña 0.00075% (mm) | DMSO (dimetilsulfóxido) (mm) |
|-------|---|--|---|------------------------------|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |

ANEXO 02: Matriz de Consistencia


| TÍTULO | PROBLEMA | OBJETIVOS | HIPÓTESIS | VARIABLES E INDICADORES | MARCO TEÓRICO | METODOLOGÍA |
|--|---|--|--|--|--|---|
| <p>Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antiséptico del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial de las hojas frescas de <i>Minthostachys mollis</i> "muña" frente al <i>Streptococcus mutans</i>.</p> | <p>Problema General ¿Tendrá efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>?</p> <p>Problemas secundarios PS1 ¿Tendrá efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.003% frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>?</p> <p>PS2 ¿Tendrá efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.0015% frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>?</p> <p>PS3 ¿Tendrá efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.00075% frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>.</p> | <p>Objetivo General Determinar el efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i></p> <p>Objetivos Específicos OE1 Determinar el efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.003% frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i></p> <p>OE2 Determinar el efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.0015% frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i></p> <p>OE3 Determinar el efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.00075% frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>.</p> | <p>Hipótesis Principal El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña presenta efecto antiséptico <i>in vitro</i> frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>Hipótesis Específicas HE1 El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.003% presenta efecto antiséptico <i>in vitro</i> frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>HS2 El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.0015% presenta efecto antiséptico <i>in vitro</i> frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>.</p> <p>HS3 El enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial obtenido de las hojas frescas de muña al 0.00075% presenta efecto antiséptico <i>in vitro</i> frente a la bacteria <i>Streptococcus mutans</i>.</p> | <p>VARIABLES INDEPENDIENTE</p> <p>Variables Independiente</p> <p>Concentración del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial de las hojas frescas muña</p> <p>Indicadores Aceite esencial de muña al 100% Aceite esencial de muña al 50% Aceite esencial de muña al 25%</p> <p>VARIABLES DEPENDIENTE</p> <p>Variables Dependiente</p> <p>Efecto antiséptico <i>in vitro</i> del enjuague bucal elaborado a base del aceite esencial de las hojas frescas muña</p> <p>Indicadores Diámetro del halo de inhibición en milímetros</p> | <p>Enfermedades bucales Caries dental <i>Streptococcus mutans</i> Enjuague bucal Plantas medicinales <i>Minthostachys mollis</i></p> | <p>Población: Las bacterias que se encuentran en la placa dentobacteriana.</p> <p>Muestra: La cepa <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Método: Prueba de efectividad bacteriana: difusión en agar con discos.</p> <p>Análisis estadístico Los resultados se sometieron la prueba de homogeneidad de varianza, ANNOVA one way y la prueba estadística Posthoc de Tukey.</p> |

ANEXO 03: Certificado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

| MicroBioLogics® | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---------|-------------|---|--------------------------------------|---|----------|---|------------------------|---|--------------------|---|-------------------|---|-------------------------|---|--------------|---|-------------------------|---|--------------------------|---|-------------------|---|-------------|---|---------------------|---|-----------------------|---|--------------------|---|---------------------|---|----------------------------|---|--------------------|---|---------------------|---|----------------------|---|------------|---|--------|---|-----------------------|---|-------------|---|----------|---|------------------------|---|---------|---|------------------------|---|-----------|---|-----------------------|---|-----------------------|---|---------------------|---|------------|---|-----------|---|----------------------------|---|---|
| Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Specifications | Additional Information | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 26613 Reference Number: ATCC® 25175™* Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2 Expiration Date: 2014/08 | Release Information: Quality Control Technologist: Karla Fjeld Release Date: 2009-02-02 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Performance | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent. | Medium: SBAP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains | Method: Gram Stain | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Vitek GP | Other Features/Challenges: Results Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="0"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Phenotypic Features</th> <th style="text-align: center;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>D-AMYGDALIN</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-XYLOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ARGININE DIHYDROLASE I</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>ALPHA-GLUCOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>CYCLODEXTRIN</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-Aspartate ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA GALACTOPYRANOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-MANNOSIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>PHOSPHATASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Leucine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>L-Proline ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA GLUCURONIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>ALPHA-GALACTOSIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>BETA-GLUCURONIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>Alanine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>Tyrosine ARYLAMIDASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-SORBITOL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>UREASE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>POLYMXIN B RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-GALACTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-RIBOSE</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>L-LACTATE alkalization</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>LACTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MALTOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>BACITRACIN RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>NOVOBIOCIN RESISTANCE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>GROWTH IN 6.5% NaCl</td><td style="text-align: center;">-</td></tr> <tr><td>D-MANNITOL</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>D-MANNOSE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> <tr><td>METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE</td><td style="text-align: center;">+</td></tr> </tbody> </table> | Phenotypic Features | Results | D-AMYGDALIN | + | PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C | - | D-XYLOSE | - | ARGININE DIHYDROLASE I | - | BETA-GALACTOSIDASE | + | ALPHA-GLUCOSIDASE | + | Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | - | CYCLODEXTRIN | - | L-Aspartate ARYLAMIDASE | - | BETA GALACTOPYRANOSIDASE | - | ALPHA-MANNOSIDASE | - | PHOSPHATASE | - | Leucine ARYLAMIDASE | + | L-Proline ARYLAMIDASE | - | BETA GLUCURONIDASE | - | ALPHA-GALACTOSIDASE | + | L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | BETA-GLUCURONIDASE | - | Alanine ARYLAMIDASE | + | Tyrosine ARYLAMIDASE | - | D-SORBITOL | + | UREASE | - | POLYMXIN B RESISTANCE | + | D-GALACTOSE | + | D-RIBOSE | - | L-LACTATE alkalization | - | LACTOSE | + | N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE | + | D-MALTOSE | + | BACITRACIN RESISTANCE | + | NOVOBIOCIN RESISTANCE | + | GROWTH IN 6.5% NaCl | - | D-MANNITOL | + | D-MANNOSE | + | METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE | + | <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> MEDIBAC INC. DISTRIBUIDOR DE MICROBIOLOGICS GARANTIZA QUE ESTE PRODUCTO Y CERTIFICADO SON ORIGINALES LOTE: _____ EXPIRACION: _____ </div> <div style="text-align: center;">  _____ AUTHORIZED SIGNATURE </div> |
| Phenotypic Features | Results | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-AMYGDALIN | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPASE C | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-XYLOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARGININE DIHYDROLASE I | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-GALACTOSIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-GLUCOSIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CYCLODEXTRIN | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Aspartate ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA GALACTOPYRANOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-MANNOSIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| PHOSPHATASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leucine ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Proline ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA GLUCURONIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ALPHA-GALACTOSIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BETA-GLUCURONIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Alanine ARYLAMIDASE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tyrosine ARYLAMIDASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-SORBITOL | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| UREASE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| POLYMXIN B RESISTANCE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-GALACTOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-RIBOSE | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| L-LACTATE alkalization | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LACTOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MALTOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| BACITRACIN RESISTANCE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NOVOBIOCIN RESISTANCE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GROWTH IN 6.5% NaCl | - | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MANNITOL | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-MANNOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| METHYL-B-D-GLUCOPYRANOSIDE | + | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div> <p>The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> </div> </div> <p>© 2009 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303</p> <p style="text-align: right;">DOC.286 REVISION 2008.February.28 dt/ml</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specifications and Performance Upon Initial Release

| Specifications | Additional Information | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|---|-------------|---|---------------------------------|---|---------|---|--------------------|---|-------------|---|------------------------|---|---------------------|---|--|
| <p>Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 26613 Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2 Expiration Date: 2014/08</p> | <p>Release Information: Quality Control Technologist: Karla Fjeld Release Date: 2009-02-02 Disclaimer: Last digit(s) of the Lot Number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The actual Lot Number is the first 5 digits of the printed lot number for Catalog #'s of 0999 or less. The actual Lot Numbers for Catalog #'s 01000 and greater are the first 6 digits of the printed lot number.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <table border="0"><tr><td>PULLULAN</td><td>-</td></tr><tr><td>D-RAFFINOSE</td><td>+</td></tr><tr><td>O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.)</td><td>+</td></tr><tr><td>SALICIN</td><td>+</td></tr><tr><td>SACCHAROSE/SUCROSE</td><td>+</td></tr><tr><td>D-TREHALOSE</td><td>+</td></tr><tr><td>ARGININE DIHYDROLASE 2</td><td>-</td></tr><tr><td>OPTOCHIN RESISTANCE</td><td>+</td></tr></table> | PULLULAN | - | D-RAFFINOSE | + | O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.) | + | SALICIN | + | SACCHAROSE/SUCROSE | + | D-TREHALOSE | + | ARGININE DIHYDROLASE 2 | - | OPTOCHIN RESISTANCE | + | |
| PULLULAN | - | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-RAFFINOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| O/129 RESISTANCE (comp.vibrio.) | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SALICIN | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SACCHAROSE/SUCROSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D-TREHALOSE | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ARGININE DIHYDROLASE 2 | - | | | | | | | | | | | | | | | | |
| OPTOCHIN RESISTANCE | + | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>Note For Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p> The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. MicroBioLogics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <p>© 2009 MicroBioLogics, Inc. All Rights Reserved. 217 Osseo Avenue North Saint Cloud, MN 56303</p> <p style="text-align: right;">DOC 286 REVISION 2008.February.28 dt/ml</p> | | | | | | | | | | | | | | | | | |



MEDIBAC INC. DISTRIBUIDOR DE MICROBIO-
LOGICS GARANTIZA QUE ESTE PRODUCTO
Y CERTIFICADO SON ORIGINALES
LOTE: _____ EXPIRACION: _____

ANEXO 04: Principales causas de consulta externa en la provincia de Huaura.
DIRESA Lima, 2012



| Primeras causas de consulta externa en la provincia Huaura. DIRESA Lima, Año 2012 | | | | | | | |
|---|---------|---|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------------------|
| Nº | CIE_X | GRUPOS DE CAUSAS | SEXO | | TOTAL | % | Tasa (x1000 Hab.) |
| | | | M | F | | | |
| 1 | J00-J06 | INFECCIONES AGUDAS DE LAS VIAS RESPIRATORIAS SUPERIORES | 18694 | 25082 | 43776 | 25.10 | 205 |
| 2 | K00-K14 | ENFERMEDADES DE LA CAVIDAD BUCAL, DE LAS GLANDULAS SALIVALES Y DE LOS MAXILARES | 7389 | 14908 | 22297 | 12.78 | 105 |
| 3 | A00 | ENFERMEDADES INFECCIOSAS INTESTINALES | 3448 | 4266 | 7714 | 4.42 | 36 |
| 4 | N30-N39 | OTRAS ENFERMEDADES DEL SISTEMA URINARIO | 994 | 5698 | 6692 | 3.84 | 31 |
| 5 | A50-A64 | INFECCIONES C/MODO DE TRANSMISION PREDOMINANTEMENTE SEXUAL | 96 | 5240 | 5336 | 3.06 | 25 |
| 6 | M40-M54 | DORSOPATIAS | 1624 | 3194 | 4818 | 2.76 | 23 |
| 7 | J40-J47 | ENFERMEDADES CRONICAS DE LAS VIAS RESPIRATORIAS INFERIORES | 2102 | 2525 | 4627 | 2.65 | 22 |
| 8 | E65-E68 | OBESIDAD Y OTROS DE HIPERALIMENTACION | 1355 | 2924 | 4279 | 2.45 | 20 |
| 9 | J20-J22 | OTRAS INFECCIONES AGUDAS DE LAS VIAS RESPIRATORIAS INFERIORES | 2064 | 2000 | 4064 | 2.33 | 19 |
| 10 | K20-K31 | ENFERMEDADES DEL ESOFAGO, DEL ESTOMAGO Y DEL DUODENO | 1177 | 2759 | 3936 | 2.26 | 18 |
| | | RESTO DE ENFERMEDADES | 24643 | 42241 | 66884 | 38.35 | 314 |
| | | TOTAL | 63586 | 110837 | 174423 | 100.0 | 818 |

Fuente: Registro Diario de Actividades de Salud HIS. DIRESA Lima 2012
Elaboración: Análisis de Situacional de Salud. Dirección de Epidemiología – DIRESA Lima

ANEXO 05: Cálculos de las concentraciones de los enjuagues bucales elaborados a base de aceite esencial obtenido de las hojas frescas del *Minthostachys mollis*

| | | |
|---|---|--|
|  |  | $\frac{0.003\text{ml}}{100\text{ml}} = \frac{100\%}{x}$ $X = \frac{0.003 \times 100}{100}$ <p>X= 0.003%</p> |
| 3 µl de aceite esencial de muña | Enjuague bucal 100 ml | |

| | | |
|---|--|---|
|  |  | $\frac{0.003\text{ml}}{100\text{ml}} = \frac{50\%}{x}$ $X = \frac{0.003 \times 50}{100}$ <p>X= 0.0015%</p> |
| 3 µl de la dilución de aceite esencial de muña con dimetilsulfóxido en proporción 1:1 | Enjuague bucal 100 ml | |

| | | |
|---|---|--|
|  |  | $\frac{0.003\text{ml}}{100\text{ml}} = \frac{25\%}{x}$ $X = \frac{0.003 \times 25}{100}$ <p>X= 0.00075%</p> |
| 3 µl de la dilución de aceite esencial de muña con dimetilsulfóxido en proporción 1:4 | Enjuague bucal 100 ml | |

En la presente investigación se utilizó un volumen de 100ml de enjuague bucal, cuando se agregó el aceite esencial al volumen en mención se tuvo que realizar el cálculo respectivo para obtener la concentración final del enjuague bucal.

ANEXO 06: Planta a recolectar de *Minthostachys mollis* “muña”



ANEXO 07: Aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”
obtenida por arrastre de vapor



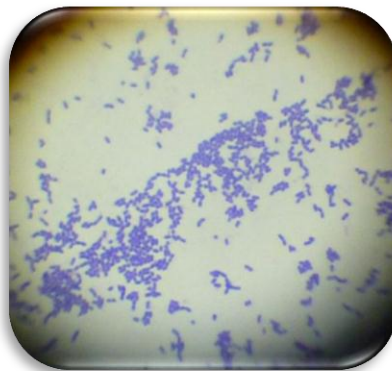
ANEXO 08: Insumos de la preparación del enjuague bucal del aceite esencial
de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”



ANEXO 09: Enjuague bucal del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña”



ANEXO 10: Coloración Gram positiva de la cepa *Streptococcus mutans*



ANEXO 11: Estandarización de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 según la escala Mc Farland 0.5



ANEXO 12: a) Extracción del inóculo de *Streptococcus mutans* con un hisopo esterilizado y b) Sembrado del inóculo de *Streptococcus mutans* en agar TSA



(a)



(b)

ANEXO 13: Preparación de discos de los enjuague bucales de aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña” al 0.00075%, 0.0015%, 0.003% y el control negativo (dimetilsulfóxido)



ANEXO 14: a) Colocación de los discos embebidos a las placas de agar TSA sembradas con *Streptococcus mutans* y **b)** Discos colocados



(a)



(b)

ANEXO 15: Medición de halos de los halos de inhibición



ANEXO 16: Rendimiento de aceite esencial

Se realizó con el volumen de destilado del aceite esencial obtenido en la probeta florentino. Por el método gravimétrico volumétrico se determinó el Porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial (%RAE) con la siguiente expresión:

$$\%RAE = \text{Vol. AE (mL)} / \text{Pmuestra (g)} \times 100$$

Dónde:

- Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.
- P muestra: Peso de la muestra a destilar en gramos.

Reemplazando:

$$\%RAE = 54 \text{ mL} / 10000 \text{ g} \times 100$$

$$\%RAE = 0.54\% \text{ v/p}$$