



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

PRE-GRADO

ESUCELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA

TESIS

EVALUACIÓN INVITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL
ACEITE ESENCIAL DE *ALLIUM SATIVUM* (AJO) SOBRE
CEPAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC 25175),
STREPTOCOCCUS SANGUINIS (ATCC10556) Y *CANDIDA*
ALBICANS (ATCC 10231)

PARA OPTENER EL TITULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

PRESENTADO POR :

Jose daniel, CHAVARRI PORTILLA

ASESOR:

Mg. CD. Eloy GAMBOA ALVARADO

Lima –octubre

2019



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

TESIS

EVALUACIÓN INVITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL
ACEITE ESENCIAL DE *ALLIUM SATIVUM* (AJO) SOBRE
CEPAS DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* (ATCC 25175),
STREPTOCOCCUS SANGUINIS (ATCC10556) Y *CANDIDA*
ALBICANS (ATCC 10231)

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA

PRESENTADO POR:

BACH. CHAVARRI PORTILLA JOSE DANIEL

ASESOR: Mg. C.D. GAMBOA ALVARADO, ELOY

LIMA - PERÚ

2019

DEDICATORIA

Al Padre Eterno, por bendecirme siempre los días.

A mis progenitores, con su paciencia y amor
incondicional

AGRADECIMIENTO

A mi asesor, el Mg. C.D.Eloy Gamboa Alvarado, por su guía, impulso e incondicional apoyo en la elaboración y ejecución de este estudio; a pesar de las adversidades.

A la Dra Carmen Aquije Dapozzo y a las personas que laboran en el laboratorio central de la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, por su apoyo en la realización de este trabajo.

A todos aquellos que aportaron en el proceso de esta investigación.

RESUMEN

El propósito de este estudio es evaluar el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepas de *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sanguinis* (ATCC 10556) y *C. albicans* (ATCC 10231). Es de tipo experimental In vitro, prospectivo, transversal y comparativo. Para determinar el tamaño muestral se aplicó la comparación de medias. El aceite esencial de *Allium sativum* inicialmente se diluyó para obtener las concentraciones a evaluar, estas son 25%, 50%, 75% y 100% (no diluido). Para la sensibilidad antimicrobiana se preparó inóculos con las cepas activadas. Azadas de colonias de cada una de las cepas fueron dispersadas en solución de CINA al 0.9% a 0.5 Mc Farland, donde 100µl de la suspensión contiene aproximadamente 10^8 UFC/ml de bacterias y 10^4 células/ml de hongos. Para la medir el efecto antimicrobiano, discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro fueron impregnados con 10µl del aceite esencial de *Allium sativum* en sus respectivas concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%. Todas las placas serán rotuladas y llevadas a incubadora por 48 horas y a 37°C. Posteriormente la actividad antimicrobiana se evaluó mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento microbiano, para luego estos datos ser registrados en Ficha de Recolección de Datos. Para el análisis univariado, se procedió a obtener las medidas de media, mediana, desviación estándar, coeficiente de variación, valor mínimo y valor máximo. Para el análisis bivariado, primero se determinó si la muestra presenta

distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk, tras la cual se determinó que la distribución era asimétrica, por lo que se utilizó la prueba Kruskal Wallis para comparar el efecto antimicrobiano del aceite esencial en diferentes concentraciones sobre cada una de las cepas cultivadas de *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sanguinis* (ATCC 10556) y *C. albicans* (ATCC 10231). Se concluyó que existe diferencias estadísticamente significativas entre los efectos antimicrobianos del aceite esencial de *Allium sativum* a diferentes concentraciones y los microorganismos orales evaluados; por lo que el aceite esencial de *Allium sativum* tiene un efecto antimicrobiano demostrado.

Palabras clave: Efecto antimicrobiano. Allium sativum. Cepa bacteriana. Streptococcus mutans. Streptococcus sanguinis. Candida albicans.

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the in vitro antimicrobial effect of the essential oil of *Allium sativum* (garlic) on strains of *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sanguinis* (ATCC 10556) and *C. albicans* (ATCC 10231). It is experimental in vitro, prospective, transversal and comparative. To determine the sample size, the comparison of means was applied. *Allium sativum* essential oil was initially diluted to obtain the concentrations to be evaluated, these are 25%, 50%, 75% and 100% (undiluted). Inoculants with the activated strains were prepared for antimicrobial sensitivity. Colony hoes from each of the strains were dispersed in 0.9% CINA solution at 0.5 Mc Farland, where 100 μ l of the suspension contains approximately 10⁸ CFU / ml of bacteria and 10⁴ cells / ml of fungi. To measure the antimicrobial effect, sterile 6 mm diameter filter paper discs were impregnated with 10 μ l of the *Allium sativum* essential oil in their respective concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%. All plates will be labeled and incubated for 48 hours and at 37 ° C. Subsequently the antimicrobial activity was evaluated by measuring the diameter of the hams of microbial growth inhibition, and then these data be recorded in the Data Collection Sheet. For the univariate analysis, we proceeded to obtain the measures of mean, median, standard deviation, coefficient of variation, minimum value and maximum value. For the bivariate analysis, it was first determined if the sample presents a normal distribution by means of the Shapiro-Wilk test, after which it was determined that the distribution was asymmetric, so the Kruskal Wallis test was used to compare the antimicrobial effect of the essential oil in different concentrations on

each of the cultured strains of *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sanguinis* (ATCC 10556) and *C. albicans* (ATCC 10231). It was concluded that there are statistically significant differences between the antimicrobial effects of the *Allium sativum* essential oil at different concentrations and the oral microorganisms evaluated; So *Allium sativum* essential oil has a proven antimicrobial effect.

Keywords: Antimicrobial effect. Allium sativum. Bacterial strain Streptococcus mutans. Streptococcus sanguinis. Candida albicans.

ÍNDICE

	Pag.
DEDICATORIA	2.
AGRADECIMIENTO	3.
RESUMEN	4.
ABSTRACT	6.
INDICE	8.
INDICE DE TABLAS	10.
INDICE DE GRAFICOS	11.
INTRODUCCION	12.
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15.
1.1 Descripción de la realidad problemática	15.
1.2 Formulación del problema	18.
1.3 Objetivos de la investigación	19.
1.3.1 Objetivo general	19.
1.3.2 Objetivos específicos	19.
1.4 Justificación de la investigación	21.
1.4.1 Importancia de la investigación	22.
1.4.2 Viabilidad de la investigación	23.
1.5 Limitaciones del estudio	23.
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	24.
2.1. Antecedentes del estudio	24.
2.1.1. Antecedentes Nacionales	24.
2.1.2. Antecedentes Internacionales	29.
2.2. Bases teóricas	32.

2.2. Definición de términos básicos	46.
CAPÍTULO III HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN	48.
3.1 Formulación de Hipótesis Principal y Derivadas	48.
3.2 Variables, dimensiones e indicadores y definición conceptual y operacional	48.
CAPÍTULO IV METODOLOGÍA	53.
4.1 Diseño metodológico	53.
4.2 Diseño muestral	53.
4.3 Técnicas e Instrumento de recolección de datos	55.
4.4 Técnicas de procesamiento de la información	59.
4.5 Técnicas estadísticas utilizadas en análisis de la información.	59.
4.6 Aspectos Éticos Contemplados	60.
CAPÍTULO V. ANALISIS Y DISCUSION	61.
5.1. Análisis descriptivo	61.
5.2. Análisis inferencial	69.
5.3. Comprobación de hipótesis	73.
5.4. Discusión.	77.
CONCLUSIONES	81.
RECOMENDACIONES	82.
FUENTES DE INFORMACION	83.
ANEXOS	
Anexo N°01: Carta de Presentación.	93.

Anexo N°02: Constancia de Desarrollo de la Investigación	94.
Anexo N°03: Ficha de Recolección de Datos	95.
Anexo N°04: Matriz de Consistencia	97.
Anexo N°05: Tamaño Muestral	98.
Anexo N°06: Certificado de taxonomía del Allium sativum	99.
Anexo N°07: Certificado de elaboración del aceite esencial del Allium sativum	100.
Anexo N°08: Certificado de cepa Streptococcus mutans (ATCC25175)	101.
Anexo N°09: Certificado de cepa Streptococcus sanguinis (ATCC 10556)	103.
Anexo N°10: Certificado de cepa Candida albicans (ATCC 10231)	105.
Anexo N°11: Fotos de la Investigación	107.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de <i>Allium sativum</i> 25% (Ajos 1)	61
Tabla 2. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de <i>Allium sativum</i> 50% (Ajos 2)	63
Tabla 3. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de <i>Allium sativum</i> 75% (Ajos 3)	65
Tabla 4. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de <i>Allium sativum</i> 100% (Ajos 4)	67
Tabla 5. Determinación de la Normalidad: Prueba de Shapiro Wilk	69
Tabla 6. Comparación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de <i>Allium sativum</i> a diferentes concentraciones %	70

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Allium sativum 25% (Ajos 1)	62
Gráfico 2. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Allium sativum 50% (Ajos 2)	64
Gráfico 3. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Allium sativum 75% (Ajos 3)	66
Gráfico 4. Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Allium sativum 100% (Ajos 4)	68
Gráfico 5. Comparación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Allium sativum a diferentes concentraciones %	72
Gráfico 6. Distribución del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Allium sativum a diferentes concentraciones %	76

INTRODUCCIÓN

Una cavidad oral sana forma parte integral orgánica de la homeostasis y del bienestar vital, inclusive es un derecho básico de todo ser humano. Cumple importantes y múltiples funciones; como el habla, la masticación, la deglución y digestión de los alimentos, y estéticas por lo que su estado de salud es vital para la. Sin embargo, la salud oral se ve afectada frecuentemente por enfermedades, principalmente lesiones cariosas y problemas periodontales, y ocasionalmente por neoplasias bucales, lesiones de VIH/SIDA, enfermedades de la mucosa y glándulas salivales; enfermedades que alteran la autoestima, bienestar y homeostasis de los pacientes.

Con el aumento en incidencia de enfermedades orales, bacterias patógenas resistentes, infecciones oportunistas en personas inmunocomprometidas y consideraciones financieras; en países en desarrollo existe un considerable interés en el desarrollo en alternativas de prevención y tratamiento.

Las plantas tradicionales pueden ser usados frente a infecciones microbianas y son considerados una buena alternativa a los químicos sintéticos. Inclusive numerosas plantas medicinales fueron evaluadas para su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades orales.

Desde tiempos antiguos el *Allium sativum* ha sido estudiado vastamente. Su alto contenido en minerales y enzimas, compuestos que poseen sulfuro, han demostrado que posee actividad antiviral, antibacteriana, antimicótica y antioxidante. El extracto de ajo ha demostrado un amplio efecto inhibitor sobre bacterias grampositivas y gramnegativas, incluso frente a microorganismos mutirresistentes como la *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella neumoniae* y *Mycobacterium tuberculosis*.

Ahora se sabe que el *S. mutans* es un microbio facultativo encontrado frecuentemente en el sistema oral humano y agente cariogénico mas importante y juega un rol en la ocurrencia de endocarditis, por lo que se considera a la caries dental un agente etiológico para las patologías generales. Inclusive existe reporte de haberse encontrado esta bacteria en placa de aterosclerosis coronaria en pacientes que murieron de ataques cardiacos.

Asimismo, el *Streptococcus sanguinis* es una bacteria comensal oral, perteneciente al grupo de estreptococos viridans y una de las especie importantes para la colonización inicial de las superficies dentales. Su papel en la enfermedad oral es incierta, pero esta especie a menudo está implicada en la endocarditis infecciosa y es, de hecho, la más frecuentemente involucrada.

Además la candidiasis es una infección oportunista frecuente en Individuos inmunocomprometidos, y la *Candida albicans* sigue siendo el principal agente etiológico en la candidosis oral, que representan el 70–80% de los aislamientos de lesiones de la mucosa oral.

Es por eso que este estudio tiene como propósito evaluar in vitro el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepas de *S. mutans* (ATCC 25125), *S. sanguinis* (ATCC 10556) y *C. albicans* (ATCC 10231).

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

La flora natural posee gran biodiversidad y posibilita una amplísima y variada aplicaciones en las diversas áreas de investigación.¹ De las cuales los aceites esenciales de 300 especies, según los autores, tienen importancia y uso comercial no solo en la farmacología sino también en la agricultura, el campo de los cosméticos y perfumes, así como en la industria alimentaria.²

El Perú está incluido dentro de las 12 áreas geográficas con abundante y variada cantidad de plantas medicinales nativas, con un 30% aproximadamente de plantas endémicas; biodiversidad considerada pilar del estudio y uso farmacológico de las plantas y la terapéutica médica tradicional, desde la época incaica hasta nuestros tiempos.^{3,4}

El *Allium sativum*, conocido como ajo, según referencias y términos científicos posee acciones hipotensoras antioxidantes, anti fúngicas entre otras. Dentro de las muchas virtudes que tiene el *Allium Sativum* predominan sus componentes azulfarados que le brindan características antibióticas importantes para la inhibición de gérmenes, razón por la cual el ajo es tan importante para el rubro farmacéutico y medicina natural.⁵

Entre sus características bioquímicas, la sustancia activa con más importancia es la alicina, dado que esta tiene fuertes efectos que inhiben diversas enzimas

como por ejemplo: la cistein -proteínas y alcohol – deshidrogenasas; estas enzimas poseen gran importancia en el desarrollo de infecciones por virus, hongos y bacterias. Otro inhibidor de enzimas es la aliína, por la cual se le considera al ajo un hipocolesteromiante, ya que influye en su gran mayoría en la biosíntesis del colesterol, esto es saludable por sus efectos a nivel cardiovascular.⁶

El ***Streptococcus mutans*** es uno de los habitantes que conforman la microbiota bucal y es el principal agente causante de lesiones cariosas dentales e infecciones bastante nocivas la bacteriemia y endocarditis. Además tiene la capacidad de acidófila y acidúrica, también se le considera como ayudante para producción de ácido y no es tan acidurico (sustancia que produce nuestro organismo en la degradación de purinas) como lo es *Streptococcus sobrinus*.^{7,8}

El ***Streptococcus sanguinis*** es un grampositivo eubiótico, estos microorganismos se encuentran principalmente en la placa dental, además se encuentra en el torrente sanguíneo usándolo como vía para llegar a las válvulas del corazón causando endocarditis, enfermedad cardiaca que muchas veces puede producir la muerte.^{9,10}

La ***Candida albicans*** es un agente micótico, perteneciente a los Sacaromicetos, diploide asexual, localizado en nuestro organismo en aparato genitourinario, mucosa digestiva, cavidad oral y sistema tegumentario.^{11,12} Se

han dado casos donde este hongo llega a desarrollarse en una patología, causando candidosis, proceso infeccioso causado por este hongo microscópico, que agrede básicamente a seres humanos inmunodeprimidos.¹³ Se presenta como una enfermedad vaginal, bucal e intestinal. Existe la posibilidad de interrelación entre la candidosis y la neoplasia maligna, a través de la formación de toxinas micóticas neoplásicas o por proceso inflamatorio crónico y procedimientos que alteran el periodo de vida celular.¹⁴

Debido a lo expuesto, la finalidad de este estudio fue evaluar in vitro el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *A.sativum* (Ajo) sobre cepas de *S.mutans* (ATCC 25125), *S.sanguinis* (ATCC 10556) y *C.albicans* (ATCC 10231).

1.2 Formulación del problema

Problema General

¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepas de *S.mutans* (ATCC 25175), *S.sanguinis* (ATCC 10556) y *C.albicans* (ATCC 10231)?

Problemas específicos

- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) en diferentes concentraciones sobre cepa de *S.mutans* (ATCC 25175)?.
- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) en diferentes concentraciones sobre cepa de *S.sanguinis* (ATCC 10556) ?.
- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) en diferentes concentraciones sobre cepa de *C.albicans* (ATCC 10231)?

1.3 Objetivos de la Investigación.

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepas de *S.mutans* (ATCC 25175), *S.sanguinis* (ATCC 10556) y *C.albicans* (ATCC 10231).

1.3.2. Objetivos específicos

- Comparar el efecto antimicrobiano in vitro y determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepa de *S.mutans* (ATCC 25175)?.
- Comparar el efecto antimicrobiano in vitro y determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepa de *S.sanguinis* (ATCC 10556) ?.
- Comparar el efecto antimicrobiano in vitro y determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepa de *C.albicans* (ATCC 10231)?

1.4 Justificación de la investigación

El Allium Sativum, conocido como ajo, según estudios científicos posee acciones hipotensoras, antioxidantes y antimicrobianas. Es gracias a sus componentes azulfarados, que le brindan propiedades antibióticas, razón por la cual es importante para la industria farmacéutica y medicina natural.

El Streptococcus mutans y el Streptococcus sanguinis son microorganismos pertenecientes a la placa dental, generan enfermedades orales y pueden provocar bacteremia y endocarditis. Mientras que la Candida albicans coloniza la cavidad oral y que en inmunodepresión causa candidiasis oral.

Ante lo expuesto, la finalidad de esta investigación fue evaluar in vitro la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Allium sativum(ajo) sobre cepas de S.mutans, S. sanguinis y C.albicans.

1.4.1 Importancia de la Investigación

La presente investigación tiene relevancia cognitiva porque aportará conocimiento nuevo de la actividad antimicrobiana del *Allium sativum* (As) (ajo) en agentes bacterianos y hongos encontrados frecuentemente en cavidad oral, la sensibilidad de estos microorganismos y la importancia que esto significaría como alternativa de terapéutica farmacológica.

Así también, a nivel social, este estudio busca beneficiar a la población en general, ya que esta planta al estar arraigada en todo el territorio nacional, sus posibles capacidades antibacterianas y antifúngicas puedan ser usadas en el tratamiento general y oral.

Asimismo, clínicamente, esta investigación busca brindar al profesional odontólogo una opción de terapéutica farmacológica, sustentado científicamente fuerte y la susceptibilidad de los microorganismos al aceite esencial (AE) de As (ajo) que permita el tratamiento más eficaz, desarrollando la producción de agentes de uso casero formulados con este vegetal.

1.4.2. Viabilidad de la Investigación

Este estudio cuenta con la colaboración y supervisión de diferentes especialistas para capacitación y entrenamiento en las diferentes etapas de la ejecución.

En los gastos e inversión se ha estimado en un aproximado de S/6180.00 soles para la realización de la investigación; el cual será autofinanciado.

El tiempo que se considera óptimo para la culminación de la investigación dependerá de las coordinaciones y autorizaciones con el laboratorio en el cual se ejecutara el trabajo.

1.5. Limitaciones del Estudio

- La adquisición de las cepas de la American Type Culture Collection (ATCC), es de cierta manera restringida, y por ello los laboratorios de referencia solicitan varios requisitos previos que sustenten su utilización.
- Disponibilidad de acceso a laboratorios de la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud de la UAP (FMCS UAP).
- Disponibilidad horaria del director asesor en la presente investigación.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación.

2.1.1. Antecedentes Nacionales

Corrales R. (2014). Lima. Publicó un artículo científico de la UNMSM, sobre la sensibilidad antibacteriana y antimicótica del *Allium sativum* en Odontología, concluyó un acercamiento de estos en contra del *S. mutans*, ser vivo microscópico cariogénico. Dando como resultado la necesidad de desarrollo continuo de estrategias científicas que posibiliten el uso de vegetales que posee efecto antimicrobiano en odontología específicamente; contra *S. mutans*, *Lactobacillus*, bacteria interviniente en del desarrollo de la caries dentinaria; *Capnocytophaga sputigena*, microorganismo periodonto patógeno; y *Candida albicans*, agente micótico causante en la candidosis a nivel de mucosa bucal.⁶

Lora C et al. (2015). Trujillo. En su investigación experimental sobre la eficacia contra microbios de concentraciones de A.s, encontraron que puede poseer efecto antifúngico sobre hongos de la piel y *C. albicans*. La investigación se realizó en personas con dermatomicosis, onicomycosis y tiña capitis, donde han dado resultados positivos que corroboran las propiedades medicinales atribuidas al *Allium Sativum*.⁹

Rojas D. (2017). Huancayo. En la revista Peruana de Medicina Integral en su investigación preliminar de la actividad del ajo en personas con elevada concentración de lípidos en sangre de la ciudad de Huancayo. Su experimento de grupo único de intervención con comparación antes-después, evaluó a 33 personas (de ambos sexos) con diagnóstico de estudio, consumieron píldoras de 1000 mg diarios por cuatro meses. Evaluándose los valores lipídicos, previo y seguido a la experiencia. A las doce semanas, se reporta disminución significativa ($p < 0,001$) de colesterol (Δ 62,4 mg/dL; IC 95%: 59.1-65.7), LDL-c (Δ 63,7 mg/dL; IC 95%: 60.3-67.1) y triglicéridos (Δ 21,5 mg/dL; IC 95%: 14,3-28,7) y aumento del HDL-c (Δ 4,1mg/dL; IC 95%: 2,9-5,3). Concluyendo que recetar por 12 sem. con píldoras de ajo en personas con dislipidemia evidenció eficacia notable en el perfil lipídico. Recomendándose ejecutar investigaciones aleatorias con la finalidad de evaluar los resultados obtenidos en este estudio. ¹⁵

Mendoza R et al. (2016). Trujillo. En su artículo acerca del AE de ajo como antimicrobiano sobre *Candida* aislada de dispositivos prótesis dentales manifiestan lo siguiente: La colonización por parte de *Candida albicans* en estructuras de las prótesis bucales se relaciona a la inflamación de la mucosa bucal. Sugieren el empleo de Fluconazol, *pero existe resistencia de los microorganismos al mismo. El AE de Allium sativum* demostró su efecto controlando la formación de biofilm, por consiguiente es eficaz sobre especies distintas de *Candida* obtenidas de prótesis dentales. En el experimento todas especies planctónicas de *Candida* presentaron sensibilidad al AE de *A. sativum*, y el 4,2% presentó resistencia al fluconazol. Con respecto a la sensibilidad en biopelícula, el 43,8% fue resistente a *A. sativum* y el 91,7% al fluconazol.¹⁶

Chaupis F et al. (2014). Lima. En su estudio experimental in vivo de la actividad hipotensora arterial del extracto del *A. sativum* con maceración de 18 semanas; tuvo como resultado que provocó una disminución, en animales de experimentación, de la presión arterial; resultando eficaz como agente hipotensor.¹⁷

Chalar L et al. (2014). Trujillo. En su artículo sobre la acción antibacteriana de la alicina del *A.sativum* sobre cepas de *S.aureus*, *Pseudomonos aeruginosa* y *Escherichia coli*. Estos microorganismos fueron sometidos a tres concentraciones diferentes. Estas 3 concentraciones lograron inhibir totalmente a *S. aureus* y *Ps. aeruginosa*. Mientras que frente a la *E. coli* no se presentó ningún efecto antibacteriano. Los controles en caldo(con alicina) fueron negativos al crecimiento bacteriano.¹⁸

Salazar M. (2016). Trujillo. En su investigación del efecto antimicrobiano sobre la *Escherichia coli*, de un extracto acuoso (EA) del ajo (*Allium sativum*) en comparación con amikacina, manifestó que usó 33 cajas petri con concentraciones diferentes de EA al 20%, 40%, 60%, 80% y 100%. En este estudio se concluyó que el EA de “ajo” tiene efecto antibacteriano sobre subespecies de *E. coli*. La concentración del extracto acuoso al 100% tiene mayor efecto con una media de 17, 7 mm y encontrándose dentro de patrones establecidos como sensible por el The Clinical & Laboratory Standards Institute. Demostrando que al 100% la mayoría de las placas tenían efectos antibacterianos.¹⁹

2.1.2. Antecedentes Internacionales

Jiménez A, Zambrano M. (2017). Quito-Ecuador. En su artículo del efecto inhibitor sobre crecimiento bacteriano del extracto ajo (*A.sativum*) y CHX al 0.12% en *S.mutans*; concluyendo que presentan similar efecto antibacteriano (e.a.). La CHX al 0.12% presenta el mayor e.a., le sigue el ajo granate y por último el ajo albo en el *S. mutans*.⁵

Alvarez G. (2014). Guayaquil-Ecuador. En su estudio, de la U. de Guayaquil, sobre el uso como antimicrobiano del extracto del *A.sativum* (e.A.s) en personas con periodopatías, pudo encontrar que usado como enjuague brinda buenos resultados como antimicrobiano, ya que ningún paciente tratado presentó alguna complicación. Así mismo el e.A.s demostró también ser un buen cicatrizante mejorando en la segunda y tercera cita con resultados alentadores entre los pacientes tratados.⁷

Sánchez F et al. (2016). Las Lunas-Cuba. En su estudios actualizados del uso médico del ajo, indican que el *Allium Sativum* posee numerosas propiedades beneficiosas para el ser humano, como agente antimicrobiano, reduce los niveles de lípidos, evita la formación de coágulos de sangre (trombos) reduciendo sus complicaciones, reduce la presión arterial, actividad antineoplásica; todo ello gracias a sus componentes sulfurados, agentes químicos responsables de las propiedades antes mencionadas. Demostrando que existen evidencias científicas que avalan su uso; formulando en concenso que se puede usar el ajo como tratamiento complementario.⁸

Paternina MJ et al. (2016). Cartagena-Colombia. En su investigación, en la Universidad de Cartagena, acerca del efecto antimicrobiano del A.s. en cepas de *Porphyromona gingivalis* y *Streptococcus mutans*; concluyeron que el extracto etanólico del A.s. demostró un efecto inhibitorio considerable de 500ppm (partes por millón) sobre estas dos bacterias, mostrando actividad bactericida.¹⁰

Ramírez H et al. (2016). Oaxaca – México. En su artículo realizó la revisión de los efectos que se obtiene de este producto natural en tratamientos de distintas patologías como enfermedades cardiovasculares y canceres demostrando su efecto bacteriostático y bactericida, además hay un efecto que atribuye en prevención de envejecimiento celular. Propiedad debida al efecto antioxidante de la cisteina y alicina.²⁰

Yaguana CS. (2015). Quito-Ecuador. En su investigación acerca de la eficacia inhibitoria de esencia de ajo y del culantro (*Coriandrum sativum*) usando la técnica de Kirby Bauer, sobre *St. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhi* y *Salmonella choleraesuis*; y comparándolos con gentamicina y ampicilina. Demostró que el culantro, no tiene efecto antibacteriano sobre las cepas usadas en el estudio, mientras que el *Allium sativum* si presentó actividad antibacteriana baja ante la *S. choleraesuis*, *S. typhi*, *E. coli* (ATCC 25922) y *E. coli*; y tambien demostró una significativo efecto antibacteriano frente sobre *St. aureus* (MRSA) y *St. aureus*. Concluyendo que para obtener halos de inhibición similares a la gentamicina debe usarse concentraciones superiores a 250 mg/dl.²¹

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. *Allium sativum* (Ajo)

El *Allium sativum* es rico en principios químicos azufrados que sustentan las capacidades farmacodinámicas y farmacocinéticas de esta planta. Se ha demostrado que tiene propiedades como antioxidante, antineoplásico, regula el sistema inmunológico y actividad antimicrobiana, etc.

Se conoce desde hace mucho tiempo ya que posee propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales, estudios previos indican que se muestra la eficiente actividad bactericida mostrando como concentraciones mínimas inhibitorias en bacterias gram - negativas 35.7-1mg/ml y en bacterias gram - positivas 142.7-35.7 mg/ml. En ensayos con el *Streptococcus mutans* se identificó la muerte inmediata de esta bacteria. Es por ello que se indica que el ajo (extracto) inhibe el crecimiento de microorganismos orales periodontopatógenos y ciertas enzimas proteolíticas, por lo que podría utilizarse en el tratamiento periodontal, particularmente en periodontitis.^{12,13}

Las propiedades del *Allium sativum* más resaltantes e importantes son sus efectos terapéuticos. El *Allium sativum* muestra su componente azucarados para suprimir la incidencia de tumores como cáncer de tejidos blandos diferentes. Siendo inhibidor de bacterias de bacterias

helicobacter pylori causante de inflamación crónica que produce cáncer gástrico. Nos muestra su efecto antimicrobiano en la cual se ha demostrado la inhibición y muerte de muchos tipos de bacterias que arriesgan la salud.^{12,13}

Efecto sobre niveles de lípidos lipoproteínas séricas disminuyendo el 29 % de los niveles de colesterol. Su efecto sobre la oxidación celular en la cual aumenta los niveles de glutatión en las células y disminuye los niveles de forma oxidada además incrementa el efecto antioxidante de otra enzima oxidante llamada superóxido dismutasa en las células protegiendo las membranas celulares de los hepatocitos de la peroxidación lipídica.^{12,13}

2.2.2. *Streptococcus mutans (S.m)*

Esta bacteria es un estreptococo grampositivo, que pertenece al grupo de microorganismos productores de ácido láctico. Crecen formando cadenas o parejas de cocos, alrededor de un solo eje de división celular. Es una bacteria anaeróbica obligada, que basa su metabolismo energético a través de los procesos de fermentación del ac. láctico. Se le considera una bacteria α Hemolítica.^{14,15}

Hace parte de la flora oral bacteriana. Los niños son más susceptibles a esta bacteria; sintetiza fructanos y glucanos a partir de la sacarosa y gracias a la Glucosiltransferasa, formando carbohidratos extracelulares,

que mejoran su adherencia a las superficies libres dentales, y a nivel intracelular, mejora la producción energética.

La síntesis de carbohidratos a nivel intracelular, glucógeno, permite la formación de ácidos sin la necesidad de consumo de polisacáridos. Dentro de su estructura, no posee núcleo definido por una carioteca, su genoma se presenta formando filamentos alargados generalmente en posición central.^{14,15}

Generalmente es conocido como patógeno dental ya que interactúa con partículas de alimentos, produciendo ácido láctico y adhiriéndose al diente permitiendo la invasión de otros microorganismos, una de las causas de caries dentaria, de igual manera es considerada como causante de bacteremias y endocarditis bacteriana, si alcanza el torrente circulatorio, (durante una extracción dental) de individuos con valvulopatías.^{14,15}

Estas bacterias forman capas de naturaleza polisacáridas, que les permite adherirse a los dientes y facilita la adherencia a las válvulas cardiacas lesionadas, si estas llegan al torrente sanguíneo; producen ácido a partir de los azúcares de la saliva y dan lugar al desgaste del esmalte y la dentina. Acorde a la diversificada estructura química de los carbohidratos de las subespecies, se clasifica en tres, siendo la c, e

y f, formados por una estructura central de ramnosa y moléculas de glucosa ubicadas lateralmente.^{14,15}

Estudios recientes designaron un serotipo de S.m como k, el caracterizado por la reducción extrema de cadenas laterales de glucosa. Destacando también este serotipo por su nivel bajo de agente etiológico de caries dental, sustentado en la mutación de antígenos de naturaleza proteica de superficie.^{14,15}

Otras investigaciones han demostrado su elevada presencia como agente etiológico patologías cardiovasculares.^{14,15}

Asimismo existen estudios que indican que una manera de transmisión directa frecuente de S.m, es el contacto directo entre la madre e hijo durante los primeros años de vida.

Una capacidad demostrada del S.m es la de su mantenimiento constante en boca de infantes mayores de cinco años, jóvenes en adolescencia y personas adultas. Proceso conocido como estabilidad “intraindividual” que alcanzan en el huésped y la interrelación entre la expresión de carácter fenotípico que otorga ventajas para su conservación en boca, como la capacidad de formar placas bacterianas, de adhesión y resistencia a los cambios constantes de pH.

Se considera frecuentemente que la invasión bucal de los infantes por S. m se produce con la primera erupción dental, más o menos a la edad

de seis meses. Pero, es racional considerar que infantes exhibidos a la transmisión directa, la adhesión ocurra antes de la erupción dental.

Siendo dos factores que influyen en esto como son:

1) La capacidad de colonización de la mucosa oral por el *S. mutans* y *S. sobrinus*.

2) El desarrollan de caries pos erupción dental en algunos infantes.

La invasión temprana de la boca por este microorganismo podría incrementar el peligro en formación de lesión cariosa y el progreso se realice en grupos etarios más prematuros.^{16,17}

Estudios demuestran una elevada relación entre serotipos de *S. mutans* obtenidas de los integrantes de una misma familia, denotando la transmisión, así como la constante invasión por este m.o. obtenidos de manera previa hasta la temprana adultez.^{18,19}

2.2.3. *Streptococcus sanguinis* (S.s)

El *Streptococcus sanguinis* es uno de los primeros colonizadores del biofilm, además forma parte de la microbiota oral y es comúnmente aislado en pacientes que presentan endocarditis bacteriana que es mortal si no se llega a tratar, son usados como ataduras para la fijación de otros microorganismos orales que colonizan la superficie del diente, forman placa bacteriana y colaboran en el origen de las lesiones cariosas y la patología de los tejidos periodontales. Además los *Streptococcus sanguinis* así como otros *Streptococcus viridans* de la boca están emergiendo como importantes patógenos del torrente sanguíneo en las infecciones que amenazan a los pacientes neutropénicos (pacientes con un número reducido de neutrófilos en la sangre).

Algunas de las más importantes características del *Streptococcus sanguinis* son la formación del polisacárido glucano desde la sacarosa, unión de plaquetas, unión a antígenos extracelular como laminina y fibronectina, unión a proteínas salivales, capacidad de coagulación con otra microflora oral y competencia genética.

Forma glucosiltransferasas, enzimas responsables de la hidrólisis de sacarosa y transfiriendo la glucosa residual a una macromolécula de glucano predeterminado, sintetizando glucanos. Para el cultivo de S.

sanguinis, puede usarse placa dental de las caras vestibulares de las piezas dentarias anteriores, en dilución en ClNa 0,9 %, se siembra 100 µL en placas de agar mitis salivarius.²⁰

2.2.4. *Candida albicans*

Especie de hongo muy habitual de la microbiota humana y asintomática coloniza los individuos sanos. Sin embargo, también es un patógeno oportunista que puede causar infecciones graves, ya menudo fatales, del torrente sanguíneo.²¹

Microorganismo inocuo, encontrándose en el cuerpo humano sin producir enfermedades, en mucosa urogenital, digestiva, bucal y piel. En casos de inmunodepresión puede producir candidosis, proceso infeccioso, que ataca por ejemplo, a pacientes VIH positivo, con patologías autoinmunitarias, terapias antineoplásicas o con trasplantes. Generalmente, las lesiones en mucosa o piel no producen daño alguno, pero pueden agravarse y volverse dañinas al atacar la mucosa intestinal o pulmonar. Inclusive la infección septicémica por *C. albicans* es de pronóstico reservado.²²

Es un hongo Ascomycota dimórfico, es decir, su morfología varía acorde a la temperatura de desarrollo: levadura a 37°C en el huésped, y micelio a 25°C en el ambiente. Se divide asexualmente por gemación. En levadura tiene forma ovalada, reunidos en grupos mínimos. Por otro

lado como micelio, con hifas alargadas y formando pseudo-hifas o pseudo-micelio. Lo que favorece bloquear la respuesta inmunitaria celular del hospedero. En forma levaduriforme es saprofita, convive simbioticamente con el hospedero, pero en forma filamentosa, actúa como parásito desencadenando manifestaciones clínicas en el hospedero. A nivel macroscópico, en agar Sabouraud forma colonias blancas, blandas, cremosas y lisas. La moniliasis o Candidiasis superficial aparece especialmente en seres humanos inmunodeprimidos; lesionando piel, mucosas (bucal, genital o entérica) y uñas. Las manifestaciones clínicas son leves como eritema, prurito y malestar. En pacientes con neoplasia maligna, operados con trasplantes o SIDA, se puede presentar Candidemia, infección hacerse sistémica y que puede ser mortal.²³

Es por mucho, el agente etiológico de micosis más importante en seres humanos, provocando desde alteraciones simples hasta procesos infecciosos invasivos y mortales en organismos con defensas bajas. El espectro de las infecciones provocadas por este microorganismo abarcan el muguet bucal, vaginitis, infecciones de piel, afecciones pulmonares, esofagitis y endocarditis.²²

Candida albicans coloca en el Phylum Ascomycota, orden Endomycetales, a la que la familia Saccharomycetaceae también pertenece, aunque *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* están

separados por 140-850 millones de años de evolución. *Candida albicans* es el hongo patógeno humano más estudiado y también sirve como un organismo modelo para el estudio de otros patógenos fúngicos más desafiantes experimentalmente, Es conocida por ser un hongo oportunista en el entorno de cualquier tipo de organismo vivo, es un modulador de pH en el biofilm y no se considera como un cariogénico, pero uno de sus hábitats es la cavidad oral de los seres humanos. *Candida albicans* coloniza de manera asintomática diversas partes del cuerpo específicamente los tractos gastrointestinal y genitourinario de personas sanas. Es un hongo comensal, pero un posible agente infeccioso oportunista, en pacientes con defensas bajas, de las mucosas y sistémicas. Es un microorganismo aerobio y se reproduce asexualmente por gemación.²⁴

El agente infeccioso frecuentemente encontrado es la *C. albicans*, hongo perteneciente a los microorganismos eubióticos y comensal de la mucosa vaginal; sin embargo, al ser un agente oportunista, puede pulular e infectar, como una levadura altamente citopatógena en pacientes inmunodeprimidos; puede desarrollar a un proceso infeccioso sistémico y dañar varios órganos internos.²⁵

2.2.5. Plantas Medicinales

2.2.5.1. Principio activo de las plantas Medicinales

Muchos investigadores ²⁶ sostienen que la presencia de principios activos (p.a.) en las plantas otorgan sus actividades curativas a las mismas, produciendo una reacción fisiológica. Estos p.a. son muy complejos, incluso se desconoce su estructura química; se ha logrado que algunos sean refinados, condensados o emulados. Encontramos en estos estados a los AE, carbohidratos y diferentes principios activos.²⁷

2.2.5.2. Generalidades del aceite esencial (AE)

Un AE es una mezcla de compuestos ligeros con características balsámicas, obtenidos de vegetales, generalmente por destilación; son principalmente fluidos y rara vez densos.²⁸⁻³⁰ Se consideran compuestos finales de la biotransformación de diferentes unidades celulares de origen vegetal, y se evita el reingreso al sistema metabólico de la célula.³¹

De igual manera Augusto,³² refiere que los AE son compuestos volátiles, formadas por un conjunto de sustancias químicas perfumadas. Se encuentran en distintas y diferentes estructuras de los vegetales, siendo estas sustancias no hidrosolubles. Morales,³³ en sus estudios encontró que la mayoría de los AE están formadas por una sustancia predominante; pero que no necesariamente las propiedades aromáticas y gustativas están determinadas por el componente primario. Otros compuestos de menor cantidad son determinantes, inclusive la calidad del AE depende de dichos componentes.³⁴

Los AE, químicamente un compuesto miscible complejo y muy variado de terpenos y alcanfores.³⁵ Están primariamente formados por hidrocarburos de fórmula C₁₀H₁₆.^{28-30,36}

2.2.5.3. Propiedades Físicas:

- Son fluidos a temperatura ambiental.
- Rara vez tiene color.
- Tienen densidad menor al agua.
- Poseen una refracción de índice elevado.
- Producen desviación de la luz polarizada.
- En solventes orgánicos son habitualmente solubles.
- Son arrastrados en agua vaporizada (son hidrosolubles).
- Punto de ebullición superior a los 100°C.³⁵

Según Miller³⁷, refiere que existen 2000 especies vegetales poseen AE. Asimismo Meyer³⁸ refiere que se desconoce con exactitud la función bioquímica que poseen los AE en los vegetales. Posiblemente deberían ser considerados como resultados propios del metabolismo de las plantas, y probablemente posean un papel a nivel ecológico. Sin embargo; otras investigaciones demuestran que los AE actúan regulando la secreción, principalmente al variar la función calórica y la presión osmótica. Secreciones como la resina, el bálsamo, etc., sirven al vegetal como compuestos defensivos frente a las patologías de estructuras dañadas.³⁹ Incluso, según varios estudios consideran que ambientales influyen en la formación de los AE.⁴⁰

Las especies vegetales de las que mayormente se extraen AE son de las Familias Rutáceas, Laureáceas, Umbelíferas, Labiadas, Compuestas, Mirtáceas, y Pináceas. Los AE son secretadas por órganos especializados glandulares, cavidades esquizógenas, etc.⁴¹

2.2.5.4. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Los AE generalmente son usados para la preservación de productos alimenticios y bebidas, tienen actividad antimicrobiana sobre el crecimiento y multiplicación de seres microscópicos. Estudios demuestran que el extracto de ajo posee actividad bactericida y bacteriostática. Inclusive se reporta que los AE disminuyen la esporulación, paralizan el crecimiento de agentes productores de enfermedades y levaduras.³⁵

2.2.5.5. Mecanismo de acción del aceite esencial sobre los M.O.

El efecto sobre los m.o es bastante complicado y aún no comprendido en su totalidad. El mecanismo de agentes químicos, depende de la especie de m.o. y primariamente se relaciona con la estructura externa. Inclusive muchos estudios refieren que interfieren en el metabolismo de los m.o inhibiendo la actividad enzimática.⁴²

2.2.5.6. Extracción del aceite esencial

Motle⁴³ según refiere en su investigación, considera los métodos detallados a continuación:

a) Obtención a expresión

b) Obtención a disolución con:

- Lípidos sólidos-fríos
- Lípidos líquidos y calientes
- Disolventes evaporables.

c) Obtención a destilación.

El efecto antimicrobiano in vitro es medible para determinar la eficacia inhibitoria microbiana de un agente en disolución, su concentración en los fluidos corporales o tisulares y la sensibilidad microbiana a concentraciones establecidas del agente. El método más usado es:

2.2.6. Método de Dilución

Cantidades diluidas de agentes antimicrobianos son incorporados en medios de cultivos ya sean caldos o agares; los medios son inoculados con los microorganismos en estudio y se incuban a temperatura que oscilan entre 37° y 40°C. A termino se mide la concentración que inhiba el desarrollo o tenga efecto microbicida sobre los m.o en estudio.^{44,45}

Actualmente, el uso de diluciones preparadas en caldos ha incrementado y sistematizado el método. Estas pruebas por microdilución permiten obtener resultados cuantitativos que determinan la concentración del agente para impedir o eliminar los m.o. en estudio.^{44,45}

2.3. Definición de términos básicos.

- **Eficacia antibacteriana:** Capacidad de un agente químicamente sintetizado para erradicar o disminuir el crecimiento bacteriano en un medio determinado, ya sea de manera directa o indirecta.⁴⁴
- **Aceite esencial:** compuesto mixto químicamente sintetizado de vegetales constituidos por terpenos y compuestos aromáticos.⁴¹
- **Streptococcus mutans:** Estreptococo grampositivo oral, anaerobio facultativo, localizado en placa bacteriana de los dientes. Relacionado con la formación e incremento de lesiones cariosas.²²
- **Streptococcus sanguinis:** Estreptococo de los primeros colonizadores del biofilm, perteneciente a la microbiota oral y es muy comúnmente aislado en pacientes que presentan endocarditis bacteriana que es mortal si no se llega a tratar, son usados como ataduras para la fijación de otros microorganismos orales que colonizan la superficie del diente, forman placa bacteriana y influyen en el origen de las caries dental y la patologías periodontales.²⁹

- **Candida albicans:** Especie de hongo más frecuente de la microbiota humana y asintomática, coloniza los individuos sanos. Sin embargo, también es un patógeno oportunista que puede causar infecciones graves, ya menudo fatales, del torrente sanguíneo.³¹
- **Cepa bacteriana:** Microorganismos obtenido de un cultivo puro con características genotípicas y fenotípicas definidas.²²

CAPÍTULO III. HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Hipótesis de la Investigación

Hipótesis General

El aceite esencial de *Allium sativum* presenta efecto antimicrobiano in vitro sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) y *Candida albicans* (ATCC 10231)

Hipótesis Especificas

H1: Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Allium sativum* sobre *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)

H2: Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Allium sativum* sobre *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

H3: Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Allium sativum* sobre *Candida albicans* (ATCC 10231)

3.2 Variables de la Investigación

3.2.1 Variable Independiente

Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum*.

3.2.2 Variable Dependiente

Cepas microbianas: *Streptococcus mutans* (ATCC 25125), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) y *Candida albicans* (ATCC 10231)

3.2.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición Operacional	Indicador	Tipo	Escala de medición	Valores
Efecto Antimicrobiano	Capacidad de generar halos de inhibición de crecimiento	Método de halo de inhibición Kirby Bauer 1966	Cuantitativa continua	Razón	mm
Aceite esencial de <i>Allium sativum</i>	Producto químico biosintetizado a partir del <i>Allium sativum</i>	Aceite esencial asignado	Cuantitativa politómica	Razón	25% 50% 75% 100%
Cepas microbianas	Microorganismos expuestos al agente antimicrobiano	Cepas asignadas	Cualitativa politómica	Nominal	S. mutans S.Sanguinis C.albicans

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

4.1 Diseño metodológico

El estudio es de tipo **experimental In vitro, prospectivo, transversal y comparativo.**

Experimental in vitro: Se controla y manipula las variables para verificar el efecto antimicrobiano in vitro del AE de *Allium sativum* sobre cepas de *S.mutans*, *S.sanguinis* y *C.albicans*; usando técnicas microbiológicas de laboratorio para el crecimiento de los microorganismos.

Prospectivo: Los resultados que se obtienen a partir de la fecha de inicio del estudio hasta el análisis de los resultados.

Transversal: Este estudio se realizará en un solo corte de tiempo.

Comparativo: Se verifica y compara el efecto antimicrobiano in vitro del AE de *Allium sativum* en sus diferentes concentraciones sobre cepas de *S.mutans*, *S.sanguinis* y *Candida albicans*.

4.2 Diseño Muestral

La unidad de análisis de esta investigación es el aceite esencial de *Allium sativum*.

La muestra incluye cepas cultivadas de agentes microbianos comúnmente hallados a nivel bucal: *S. mutans* (ATCC 25125), *S. sanguinis* (ATCC 10556)

y *C.albicans* (ATCC 10231), que cumplen los criterios de inclusión y exclusión de la investigación. Aplicando comparación de medias sobre resultados del estudio piloto realizado (Anexo 4), se obtuvo n=3, pero para la presente investigación se utilizó n=20 para que los resultados tengan mayor valor estadístico.

Serán considerados los siguientes grupos:

- Grupo 01: Placas Petri inoculadas con *S.mutans* (ATCC 25125).
- Grupo 02: Placas Petri inoculadas con *S. sanguinis* (ATCC 10556).
- Grupo 03: Placas Petri inoculas con *C. albicans* (ATCC 10231).

Criterios de inclusión y exclusión

Criterios de inclusión:

- Las cepas microbianas tienen que ser propias de la cavidad bucal.
- Las cepas microbianas deben estar relacionadas con patologías orales.
- Muestras fácilmente cultivables en los medios.
- La sensibilidad antimicrobiana de las muestras deben ser evaluadas a través de la medición del diámetro de halos de inhibición de crecimiento.

Criterios de exclusión:

- Agentes microbianos susceptibles a factores externos a las pruebas a las cuales van a ser sometidos.
- Microorganismos que estén fuera de alcance para su adquisición por parte del investigador.
- Microorganismos que no tengan relevancia para la odontología.

4.3 Técnicas e Instrumento de recolección de datos

Obtención de permiso para realizar la investigación

Se gestionó documento dirigido a la Directora de la Escuela Profesional de Estomatología solicitando autorización para el uso del Lab. De la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Alas Peruanas y realizar el estudio **Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Allium sativum (ajo) sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25125), Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) y Candida albicans (ATCC 10231). (Anexo 01)**

Obtención del aceite esencial de Allium sativum (ajo)

Recolección de Allium sativum

Se obtuvo el AE de bulbos de plantas frescas producidas en la región Arequipa, por ser la zona geográfica de mayor producción de esta hortaliza, con un máximo de dos días de almacenamiento, y recolectados de centros

de acopio en Lima. Se recolectó 10 kilogramos de la materia prima, que fue rociada con alcohol al 70% para desinfección y eliminar artrópodos. Luego son forradas con papel kraft para el almacenamiento y proceso.

Obtención del aceite esencial

Se obtuvo el AE de 10 kilogramos de bulbos de *Allium sativum* (ajo), sometidos a destilación por arrastre de vapor de agua, en un equipamiento de acero inoxidable para evaporación. El destilado se separó considerando las propiedades de invisibilidad y densidades diferentes del AE y agua, usando una bomba de decantación, posteriormente el aceite esencial obtenido de la muestra vegetal se guardó en recipientes herméticos de vidrio, color ámbar y refrigerados a 4°C de temperatura.⁵⁶

Reactivación de la Cepas Bacterianas

En el presente estudio se hizo uso de las siguientes cepas microbianas estándar American Type Culture Collection (ATCC):

- *Streptococcus mutans* (ATCC25125)
- *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556)
- *Candida albicans* (ATCC 10231)

Para la reactivación de las cepas microbianas, estas se mantuvieron en refrigeración a temperatura de 2° - 8 °C desde su adquisición hasta la reactivación en el Laboratorio Central UAP. Las muestras estaban contenidas en sus respectivos envases Kwik – Stick TM. Se retiraron del recipiente y

considerando las disposiciones del fabricante, las muestras de *S.mutans* (ATCC 25175) y *S.sanguinis* (ATCC 10556) son sembradas en 05 placas conteniendo el medio de cultivo TSA cada una, mientras que la muestra de *Candida albicans* (ATCC 10231) en 05 placas Petri conteniendo agar Sabouraud (AS); y llevadas a incubar por 48 horas y a 37°C. Este paso se realizó en un tiempo no mayor a 5 minutos.⁵⁷

Actividad Antimicrobiana

Método de difusión en disco

El AE de *Allium sativum* inicialmente se diluyó para obtener las diferentes concentraciones de estudio, a 25%, 50%, 75% y 100%; la ultima es el aceite esencial sin dilución.

Para la sensibilidad antimicrobiana se preparó inóculos con las cepas activadas. Azadas de colonias de cada una de las cepas fueron dispersadas en solución de CINA al 0.9% a 0.5 Mc Farland, donde 100µl de la suspensión contiene aproximadamente 10^8 UFC/ml de bacterias y 10^4 células/ml de células micóticas. Estos inóculos se extendieron por difusión en placas Petri con TSA y AS.

Para la medir el efecto antimicrobiano, discos de papel filtro estériles de 6 mm de diámetro fueron embebidos con 10µl del AE de *Allium sativum* a

respectivas concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, luego fueron posicionados íntimamente sobre los agares ya inoculados con las respectivas cepas. Como control positivo del experimento, en las cajas petri inoculadas con los estreptococos se colocará un disco de 6 mm impregnado con 100µl de ampicilina, mientras en las inoculadas con *Candida* con 100µl de miconazol; proceso repetido 4 veces para establecer una media del efecto antibacteriano y antifúngico respectivamente.⁵⁸

Las placas serán rotuladas y llevadas a incubadora por 48 horas y a 37°C. Posteriormente el efecto antimicrobiano se determinó mediante la medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento microbiano, para luego estos datos ser registrados en Ficha de Recolección de Datos (Anexo 02)

4.4. Técnicas de procesamiento de la información

En la presente investigación una vez recolectados los resultados de los halos de inhibición, se creó una base de datos con el programa Microsoft Excel 2016 y se analizó los resultados con el paquete estadístico Stata 12 que permitió la elaboración de tablas y gráficos numéricos descriptivos, así también la aplicación de la prueba necesaria para la contratación de la hipótesis.

4.5. Técnicas estadísticas utilizadas en el análisis de la información

Para el análisis univariado, se procedió a obtener las medidas de media, mediana, desviación estándar, coeficiente de variación, valor mínimo y valor máximo de la variable efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Allium sativum* (ajo) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25125), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

Para el análisis bivariado, primero se evaluó la normalidad de los resultados mediante la prueba de Shapiro-Wilk, determinándose que la distribución era asimétrica, y utilizándose la prueba Kruskal Wallis para comparar el efecto antimicrobiano del aceite esencial en diferentes concentraciones sobre cada una de las cepas cultivadas de *S. mutans* (ATCC 25125), *S. sanguinis* (ATCC 10556) y *C. albicans* (ATCC 10231).

4.5 Aspectos éticos contemplados.

Este estudio se ejecutó en el Lab. Central de la FMHCS UAP, y al ser experimental in vitro, no se necesitó modelos biológicos, sólo se utilizó cepas microbianas. Asimismo, se utilizó materiales e instrumental de laboratorio para evaluar el efecto antimicrobiano (EA) del AE de *A.sativum*; y no requirió de consentimiento informado al no involucrar a personas.

CAPÍTULO V. ANALISIS Y DISCUSION

5.1. Análisis descriptivo

Tabla N° 1
Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de
***Allium sativum* 25% (Ajos 1)**

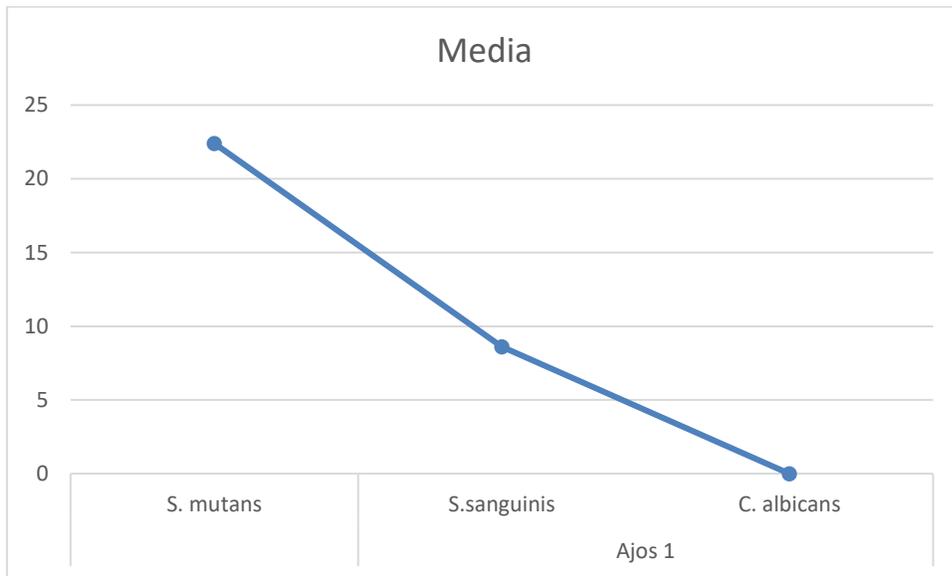
	M.O.	Media	DS	Min	Max
Ajos 1	<i>S. mutans</i>	22.4	1.1	20.6	24.9
	<i>S.sanguinis</i>	8.6	8.6	7.8	10.1
	<i>C. albicans</i>	0	0	0	0

Fuente: Propia del investigador

INTERPRETACION: En la Tabla N°1 se puede apreciar que el AE de ***Allium sativum*** al 25% tuvo el mayor EA contra la cepa de ***S. mutans (ATCC 25125)*** con una media de 22.4 mm; siendo la media 8.6 mm para la cepa de ***S.sanguinis (ATCC 10556)***. Mientras que frente a la cepa de ***C.albicans (ATCC 10231)*** se referenció nula actividad.

Grafico N° 1

Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* 25% (Ajos 1)



Fuente: Propia del investigador

Tabla N° 2

Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* 50% (Ajos 2)

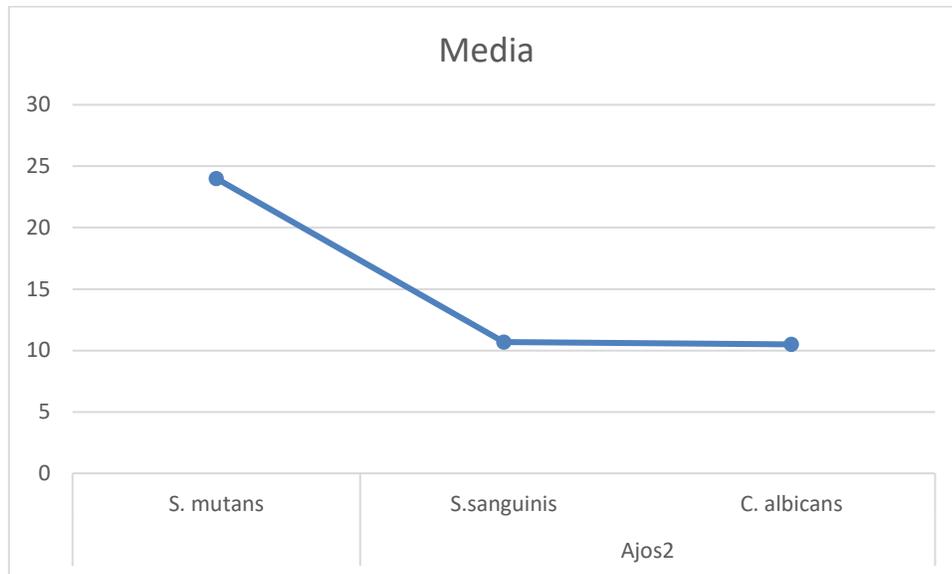
	M.O.	Media	DS	Min	Max
	<i>S. mutans</i>	24	1.2	20.7	25.9
Ajos2	<i>S.sanguinis</i>	10.7	11	9.2	11.7
	<i>C. albicans</i>	10.5	0.8	9.1	12.1

Fuente: Propia del investigador

INTERPRETACION: En la Tabla N° 2 se puede apreciar que el AE de *Allium sativum* al 50% tuvo el mayor EA contra la cepa de *S.mutans* (ATCC 25125) con una media de 24 mm. La media para la cepa de *S.sanguinis* (ATCC 10556) es 10.7; mientras que frente a la cepa de *C.albicans* (ATCC 10231) se encontró la menor actividad con una media de 10.5mm.

Grafico N° 2

Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* 50% (Ajos 2)



Fuente: Propia del investigador

Tabla N° 3
Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* 75% (Ajos 3)

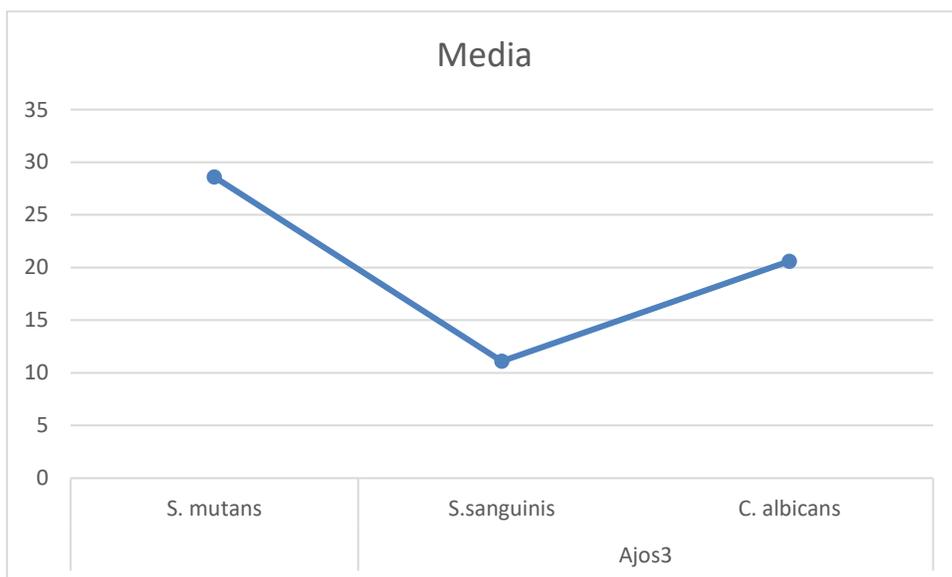
	M.O.	Media	DS	Min	Max
Ajos3	<i>S. mutans</i>	28.6	2.3	23.7	32.6
	<i>S.sanguinis</i>	11.1	1.3	8.7	13.6
	<i>C. albicans</i>	20.6	1.4	17.9	23.1

Fuente: Propia del investigador

INTERPRETACION: En la Tabla N° 3 se puede apreciar que el AE de ***A.sativum*** al 75% tuvo el mayor EA contra la cepa de ***Streptococcus mutans (ATCC 25125)*** con una media de 28.6 mm. La media para la cepa de de ***C.albicans (ATCC 10231)*** es 20.6 mm.. Mientras que frente a la cepa ***S.sanguinis (ATCC 10556)*** se encontró la menor actividad con una media de 11.1 mm.

Gráfico N° 3

Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* 75% (Ajos 3)



Fuente: Propia del investigador

Tabla N° 4
Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* 100% (Ajos 4)

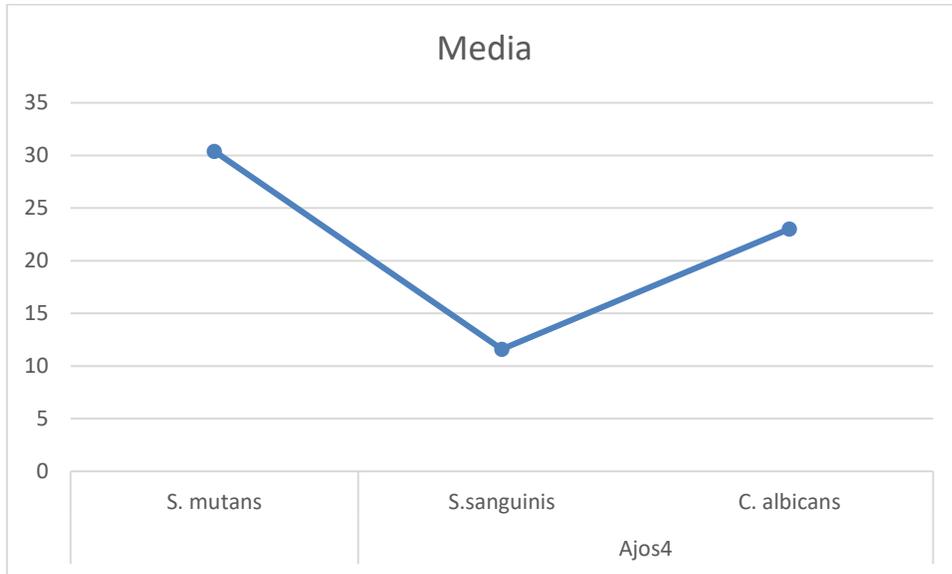
	M.O.	Media	DS	Min	Max
Ajos4					

Fuente: Propia del investigador

INTERPRETACION: En la Tabla N° 4 se puede apreciar que el AE de ***Allium sativum*** al 100% tuvo el mayor EA contra la cepa de ***S.mutans (ATCC 25125)*** con una media de 30.4 mm. La media para la cepa de ***C.albicans (ATCC 10231)*** es 23 mm. Mientras que contra ***S.sanguinis (ATCC 10556)*** se encontró la menor actividad 11.6 mm.

Gráfico N° 4

Evaluación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* 100% (Ajos 4)



Fuente: Propia del investigador

5.2. Análisis Inferencial

Tabla N° 5

Determinación de la Normalidad: Prueba de Shapiro Wilk

```
. swilk aceiteesenencialliumsativum streptococcusmutansatcc25125  
streptococcusanguinisatcc10556
```

Shapiro-Wilk W test for normal data

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
-----+-----					
aceiteesen~m	80	0.99630	0.254	-3.004	0.99867
strept~25125	80	0.95480	3.103	2.481	0.00655
strept~10556	80	0.97641	1.619	1.056	0.14543

El valor 0.00655 al ser menor a 0.05 NO TIENE DISTRIBUCION NORMAL por lo tanto se debe usar una prueba no paramétrica como Kruskal wallis.

Tabla N° 6

Comparación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* a diferentes concentraciones %

		Media	DS	Min	Max
Ajos 1	S. mutans	22.4	1.1	20.6	24.9
	S.sanguinis	8.6	8.6	7.8	10.1
	C. albicans	0	0	0	0
Ajos2	S. mutans	24	1.2	20.7	25.9
	S.sanguinis	10.7	11	9.2	11.7
	C. albicans	10.5	0.8	9.1	12.1
Ajos3	S. mutans	28.6	2.3	23.7	32.6
	S.sanguinis	11.1	1.3	8.7	13.6
	C. albicans	20.6	1.4	17.9	23.1
Ajos4	S. mutans	30.4	2.3	27.7	35.6
	S.sanguinis	11.6	1.3	9.5	13.9
	C. albicans	23	1.4	20.7	26.3

Fuente: Propia del investigador

Estadística inferencial (Prueba de Kruskall Wallis) $p = 0.001$ ($p < 0.05$) en todos los grupos*

Normalidad $p > 0.05$ (Prueba Shapiro wilk)

INTERPRETACIÓN. Al realizar la estadística inferencial se encontró que existió diferencias estadísticamente significativas entre todas concentraciones del AE de *Allium sativum* y los microorganismos evaluados; lo que quiere decir que el **AE de**

Allium sativum tiene un efecto antimicrobiano demostrado frente a las cepas microbianas en estudio.

Por lo que se puede apreciar que el AE de **Allium sativum** al 25 % tuvo el mayor efecto antimicrobiano contra el **S.mutans (ATCC 25175)** con una media de 22.4mm. Para el AE de **Allium sativum** al 50% también el **S.mutans (ATCC 25175)** fue afectado mayoritariamente con una media de 24mm de halo de inhibición. Para el AE de **A.sativum** al 75%, se encontró similar efecto contra el **Streptococcus mutans (ATCC 25175)** con 28.6mm. Finalmente en el AE de **Allium sativum** al 100%, el **Streptococcus mutans (ATCC 25175)** también fue afectado prioritariamente con una media de 30.4mm.

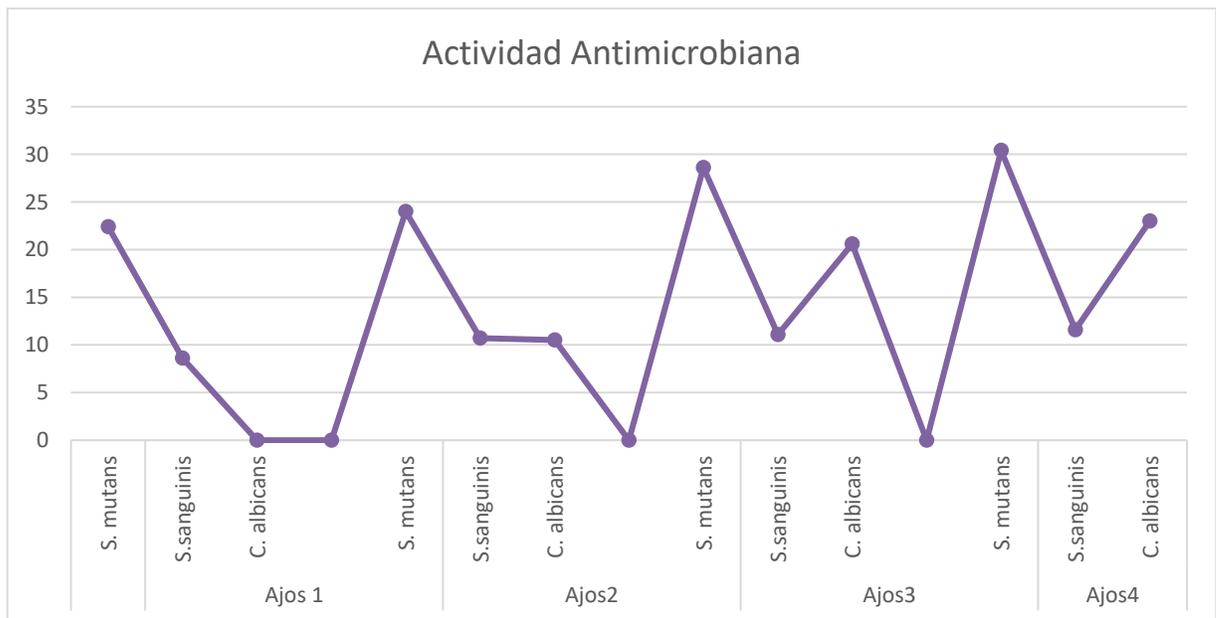
Con respecto al **Streptococcus sanguinis (ATCC 10556)** se puede apreciar que el AE de **Allium sativum** al 25 % tuvo efecto antimicrobiano con una media de 8.6 mm. Para el AE de **Allium sativum** al 50% también el **S.sanguinis (ATCC 10556)** fue afectado con una media de 10.7mm de halo de inhibición. Para el AE de **Allium sativum** al 75%, se encontró similar efecto contra el **S.sanguinis (ATCC 10556)** con 11.1mm. Finalmente en el AE de **Allium sativum** al 100%, el **S.sanguinis (ATCC 10556)** también fue afectado prioritariamente con una media de 11.6mm.

Por último frente a la **C.albicans (ATCC 10231)** se puede apreciar que el AE de **Allium sativum** al 25 % no tuvo efecto antimicrobiano con una media de 0 mm. Para el AE de **Allium sativum** al 50% la **Candida albicans (ATCC 10231)** fue afectada con una media de 10.5 mm de halo de inhibición. Para el AE de **Allium sativum** al 75%, se encontró efecto contra la **Candida albicans (ATCC 10231)** con

un 20.6 mm. Finalmente en el AE de *Allium sativum* al 100%, la *Candida albicans* (ATCC 10231) también fue afectado prioritariamente con una media de 23 mm.

Gráfico N° 5

Comparación del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* a diferentes concentraciones %



Fuente: Propia del investigador

5.3. Comprobación de hipótesis

Estadística inferencial Comparativa

```
. kwallis streptococcusmutansatcc25125, by(aceiteesencialalliumsativum)
```

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

```
+-----+
| aceite~m | Obs | Rank Sum |
+-----+-----+-----+
|         1 | 20 |   280.00 |
|         2 | 20 |   555.50 |
|         3 | 20 |  1125.50 |
|         4 | 20 |  1279.00 |
+-----+

chi-squared =    61.590 with 3 d.f.
probability =     0.0001
```

```
. kwallis streptococcussanguinisatcc10556, by(aceiteesencialalliumsativum)
```

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

```
+-----+
| aceite~m | Obs | Rank Sum |
+-----+-----+-----+
|         1 | 20 |   243.00 |
|         2 | 20 |   871.00 |
|         3 | 20 |   990.00 |
|         4 | 20 |  1136.00 |
+-----+

chi-squared =    42.952 with 3 d.f.
probability =     0.0001
```

```
. kwallis candidaalbicansatccl0231, by(aceiteesencialalliumsativum)
```

```
Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test
```

```
+-----+
| aceite~m | Obs | Rank Sum |
|-----+-----+-----|
|         1 |  20 |   210.00 |
|         2 |  20 |   610.00 |
|         3 |  20 |  1058.50 |
|         4 |  20 |  1361.50 |
+-----+
```

```
chi-squared =    70.917 with 3 d.f.
```

```
probability =    0.0001
```

Estadística inferencial (Prueba de Kruskal Wallis) $p = 0.001$ ($p < 0.05$) en todos los grupos*

Normalidad $p > 0.05$ (Prueba Shapiro wilk)

Al realizar la estadística inferencial se encontró que existió diferencias estadísticamente significativas entre los efectos antimicrobianos del AE de **Allium sativum** a diferentes concentraciones y los microorganismos orales evaluados lo que quiere decir que el AE de **Allium sativum** tiene un efecto antimicrobiano demostrado.

Por lo tanto, se acepta la hipótesis general: El AE de *Allium sativum* presenta EA in vitro sobre cepas de *S.mutans* (ATCC 25125), *S.sanguinis* (ATCC 10556) y *C.albicans* (ATCC 10231)

Asimismo, se acepta las hipótesis específicas:

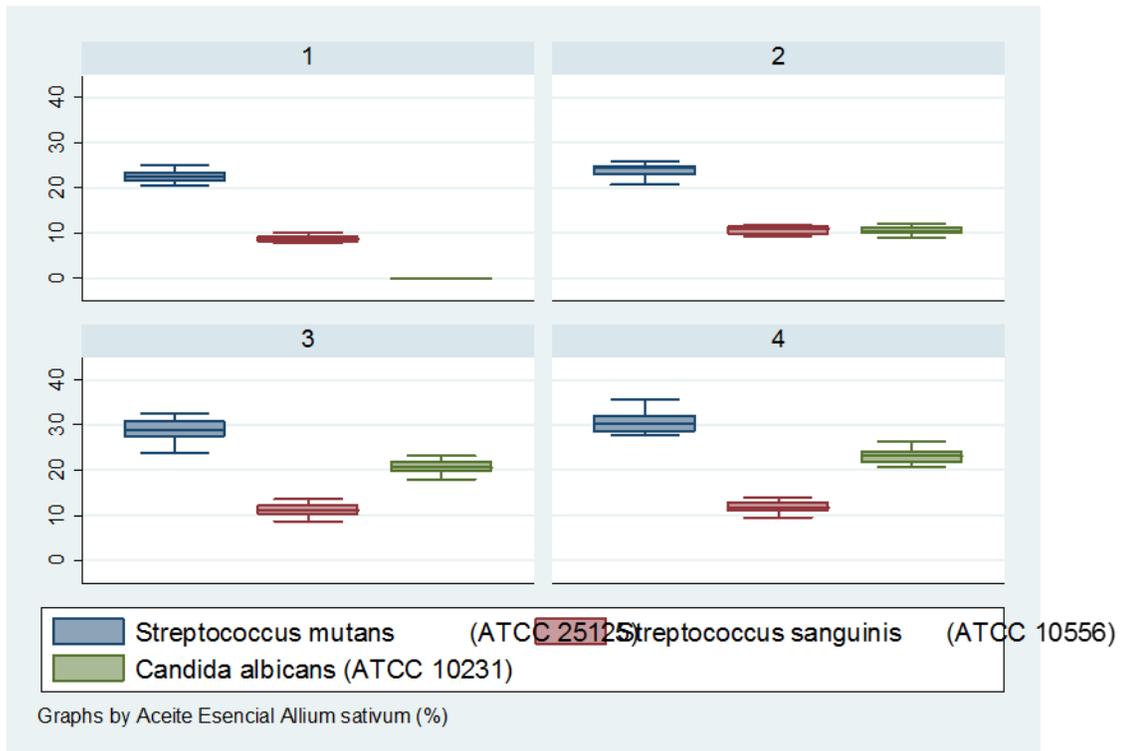
H1: Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del AE de *Allium sativum* sobre *S.mutans* (ATCC 25175)

H2: Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del AE de A.s sobre *S.sanguinis* (ATCC 10556).

H3: Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del AE de A.s sobre *C.albicans* (ATCC 10231)

Gráfico N° 6

Distribución del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum* a diferentes concentraciones %



5.3. Discusión.

Acorde a los objetivos de estudio se realizó la evaluación del efecto antifúngico del AE de la planta A.s más conocida como ajo, buscando identificar que efecto tiene esta sobre microbios orales como lo son el *S.mutans* presente en los procesos cariogénicos que se dan en la estructura dentaria; el *S.sanguinis*, especie importante en la colonización primaria de los tejidos orales y precursor de la formación del biofilm; y de la *Candida albicans*, especie micótica responsable de la Candidiasis oral, especialmente la psedomembranosa que es la más frecuente y que implica probablemente que el paciente este con inmunodepresión.

Es importante saber que todas las plantas son capaces de sintetizar los productos que requieren para su crecimiento y desarrollo por medio de rutas metabólicas y estas rutas se conocen como metabolitos primarios y secundarios, los cuales a su vez le atribuyen características y propiedades especiales a la planta. Las plantas medicinales a partir del metabolito primario son capaces de sintetizar los metabolitos secundarios los cuales ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre los organismos vivos.

Al analizar los resultados obtenidos en la presente investigación se encontró que existió diferencias estadísticamente significativas entre los efectos antimicrobianos del AE de *Allium sativum* a diferentes concentraciones y los microorganismos orales evaluados lo que quiere decir que el AE de *Allium sativum* tiene una

actividad antimicrobiana demostrada sobre las cepas de ***S. mutans* (ATCC 25175)**, ***S. sanguinis* (ATCC 10556)** y ***C. albicans* (ATCC 10231)**.

De los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano del AE de ***Allium sativum*** sobre la cepa de ***S. mutans* (ATCC 25175)**, se puede apreciar que el aceite esencial al 25%, 50%, 75% y 100% obtuvieron una media de 22.4 mm, 24 mm, 28.6 mm y 30.4 mm respectivamente, resultados con tendencia ascendente acorde al aumento de concentración de aceite esencial de ajo, similares a los obtenidos por **Fani et al (2007)**⁶ en cuya investigación encontraron halos de inhibición e alrededor de 22 a 44 mm de diámetro usando en este caso un extracto de *Allium sativum*. Inclusive estos resultados son sustentados por la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de ajo de 37.5% obtenido por **Manurung L et al (2017)**⁵⁹ sobre cepa de *Streptococcus mutans*. A su vez estos resultados difieren con los obtenidos por **Chavan et al (2010)**⁶⁰ que encontró halos de inhibición de 12 mm y 14 mm usando colutorios a base de extracto etanólico de ajo pero a una concentración de 9% y 10% respectivamente, pero que sustentan la tendencia ascendente acorde al aumento de concentración del agente *Allium sativum*.

De los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Allium sativum* sobre la cepa de ***Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)**, se puede apreciar que el aceite esencial al 25%, 50%, 75% y 100% obtuvieron una media de 8.6 mm, 10.7 mm, 11.1 mm y 11.6 mm respectivamente, resultados con tendencia mínimamente ascendente acorde al aumento de concentración de aceite esencial de ajo, pero diferentes a los resultados obtenidos por **Houshmand et al (2013)**⁶¹

que al 5%, 10%, 20% y 100% de extracto de ajo, obtuvo halos de inhibición menores a 10 mm de diámetro para *Streptococcus sanguinis*, que implicaría que el aceite esencial de ajo tiene mayor concentración de agentes químicos antimicrobiano que los extractos de ajo.

Con respecto a la cepa ***C.albicans (ATCC 10231)***, de los resultados obtenidos del efecto antimicrobiano del AE de A.s, se puede apreciar que el aceite esencial al 25%, 50%, 75% y 100% obtuvieron una media de 0 mm, 10.5 mm, 20.6 mm y 23 mm respectivamente, resultados que difieren con resultados de **Lora et al (2010)**⁹ que refiere que a partir de una concentración de 0.5%(5000µg/ml) existe efecto antifúngico, ya que en esta investigación se encontró dicho efecto a partir de aceite esencial a una concentración de 50% para este microorganismo; la diferencia se sustentaría en el uso de ajo liofilizado en el estudio de referencia, que concentraría más los agentes productores del efecto antifúngico. Asimismo, nuestros resultados son similares a los obtenidos por **Nirwana et al (2018)**⁶² quienes, usando extracto puro de ajo, encontraron que a concentraciones mayores a 20% el efecto antifúngico aumenta sobre la *Candida albicans* y sustentado en sus mediciones de UFC/ml que a concentraciones de 20%, 30% y 40%, ascendían a 162.1, 125.0 y 87.8 respectivamente; lo que es congruente con la tendencia ascendente del efecto antifúngico de nuestra investigación. Y que anteriores investigaciones corroboran como la de **Lora et al (2010)**⁹ que estudiaron el efecto fungicida mediante subcultivos en Agar Sabouraud a partir de los tubos que no presentaron turbidez encontrándose que a 5000 ug/mL no desarrolló la levadura, por lo que a mayor

concentración mayor efecto fungicida; lo que a su vez, esta tendencia ascendente es compatible con el efecto antifúngico de este estudio, que demostró con respecto a *Candida albicans* que a mayor concentración mayor es el efecto antifúngico.

CONCLUSIONES

- Existe diferencias estadísticamente significativas entre los efectos antimicrobianos del AE de **A.s** a diferentes concentraciones y los microorganismos orales evaluados; por lo que el AE de **A.s** posee una actividad antimicrobiana demostrada.
- Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del AE de A.s sobre **S.mutans (ATCC 25175)**, por lo que tiene efecto antimicrobiano comprobado frente a este microorganismo a todas las concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%); siendo calificada como alto según la escala de Duraffourd.
- Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del AE de A.s sobre **S.sanguinis (ATCC 10556)**, por lo que tiene efecto antimicrobiano comprobado frente a este microorganismo a todas las concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%); siendo calificada como bajo según la escala de Duraffourd.
- Existe diferencias estadísticamente significativas de las diferentes concentraciones del AE de A.s sobre **Candida albicans (ATCC 10231)**, por lo que tiene efecto antimicrobiano comprobado frente a este microorganismo a concentraciones de 50%, 75% y 100%; siendo calificada como bajo para 50% y alta para 75% y 100% según la escala de Duraffourd.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que corroboren el efecto antimicrobiano y citotóxico del *Allium sativum*, mediante pruebas cualitativas y cuantitativas, que permitan su uso en terapia alternativa frente a infecciones orales.
- Realizar estudios para medir la eficacia antimicrobiana del A.s en otros microbios patógenos de la cavidad oral.
- Fomentar el estudio fitoquímico del *Allium sativum* para identificar fehacientemente el agente responsable o responsables del efecto antimicrobiano del *Allium sativum* y sea considerado como alternativa terapéutica oral.
- Elaborar productos de uso oral en base al *Allium sativum* he investigar la eficacia antimicrobiana y efecto de citotoxicidad de los mismos buscando alternativas terapéuticas para los procesos infecciosos de la cavidad oral.

FUENTES DE INFORMACION

1. Vila R, Santana A, Perez R, Valderrama A, Castelli M, Mendonca S, Zacchino S, Gupta M, Cañigueral S. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinnia cerrocampaensis*, a new source of α - bisabolol. *Bioresour Technol* 2010; 101(7): 2510 – 4.
2. Ghribi L, Nejma A, Besbes M, Harzalla-Skhiri F, Flamini G, Jannet H. Chemical Composition, Citotoxic and Antibacterial Activity of the Essential Oil from the Tunisian *Ononis angustissima* L (Fabaceae). *J Oleo Sci* 2016; 65(4): 339 – 45.
3. Contreras G. Actividad antimicrobiana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* (muña) frente a bacterias enteropatógenas. Tesis de bachiller para Biólogo. Lima: UNALM; 1983.
4. Munares M. Estudio del aceite esencial de muña en almacenaje de papa como inhibidor de brotamiento de microorganismos. Tesis de bachiller para Ingeniero en Industrias Alimentarias. Lima: UNALM; 1983.
5. Jimenez A, Zambrano M. Efecto antibacteriano del extracto de *Allium Sativum* (ajo) blanco, purpura y clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans*. [Tesis Título]. Quito: Carrera de Odontología, Universidad Central del Ecuador; 2015.
6. Corrales IE, Reyes JJ. Actividad antimicrobiana y antifúngica de *allium sativum* en Estomatología. *Revista* 16 de abril. 2014; (254): 59 - 68.

7. Alvarez S. Estudio sobre la utilización del extracto del *Allium Savitum* “Ajo” como antimicrobiano en pacientes con problemas periodontales. [Tesis Título]. Guayaquil: Facultad Piloto de Odontología, Universidad de Guayaquil; 2014.
8. Sanchez EM, Rojas S, Agüero N. Investigaciones Actuales del Empleo de *Allium Sativum* en Medicina. Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta. 2016; 41(3): 1-9.
9. Lora C, Luján M, Robles H, Saravia V, Cabeza J. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de *Allium sativum* “ajo” frente a dermatofitos y *Candida albicans*. UCV – Scientia. 2010; 2(2): 23 – 33.
10. Paternina MJ, Villarreal D, Herrera A, Díaz A. Efecto antimicrobiano del extracto de *Allium sativum* en *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*. [Trabajo de Grado]. Cartagena: Facultad de Odontología, Universidad de Cartagena; 2016.
11. C. Chitmanat; K. Tongdonmuan; P. Khanom; P. Pachontis & W. Nunsong (2005). "Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some *Tilapia* (*Oreochromis niloticus*) pathogens". *Acta Horticulturae*. pp. 179–182.
12. Ryan KJ; Ray CG (editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed. edición). McGraw Hill.
13. Enfert C; Hube B (editors) (2007). *Candida: Comparative and Functional Genomics*. Caister Academic Press.
14. CCM Salud. www.salud.ccm.net

15. Rojas A. Efectos del *Allium sativum*, Ajo, en pacientes con dislipidemia en la ciudad de Huancayo. Estudio Preliminar. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*. 2016; 1(4): 11 – 15.
16. Mendoza-Juache a, Aranda-Romo S, Bermeo-Escalona J, Gómez-Hernández A, Pozos-Guillén A, Sánchez-Vargas L. The essential oil of *Allium sativum* as an alternative agent against *Candida* isolated from dental prostheses. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(3):158–164.
17. Chaupis D, Rojas J, Gasco M, Gonzales G. Efecto Hipotensor del Extracto de Ajo (*Allium sativum*) macerado por 18 semanas en un modelo experimental In Vivo. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;31(3):461-466.
18. Chalar L, Maya J, Vargas E, Dejas M, Romero B. Función Antimicrobiana de la Alicina de Ajo en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. *Rev Cient Cienc Méd*. 2014; 17(1): 26 – 28.
19. Salazar M. Eficacia Antibacteriana del Extracto Acuoso del *Allium Sativum* “Ajo” comparado con Amikacina en *Escherichia coli*. [Tesis Grado]. Trujillo: Escuela Académico Profesional de Medicina, Universidad Cesar Vallejo; 2016.
20. Ramírez H, Castro L, Martínez E. Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium Sativum*). *Salud y Administración*. 2016; 3(8): 39 – 47.
21. Yaguana CS. Evaluación del efecto antibiótico de los extractos acuosos de *Allium sativum* (ajo) y de *Coriandrum sativum* (culantro) mediante el método de sensibilidad por difusión en agar Bauer-Kirby, sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica serovar typhi* y

- Salmonella entérica serovar choleraesuis; en comparación con los antibióticos gentamicina y ampicilina. [Tesis Título]. Quito: Escuela de Bioanálisis, Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2015.
22. Pava Ángel T. Actividad antimicrobiana de extractos de *Allium Sativum* y *Zingiber officinale* sobre microorganismos de importancia en patologías infecciosas de la cavidad oral. [Trabajo de grado]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2016.
23. Ramírez H, Castro L, Martínez E. Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium Sativum*). *Salud y Administración*. 2016; 3(8): 39 – 47.
24. Nakano et al. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2006; 44(9):3313–7.
25. Martínez MC, Rodríguez A. Estudio de las cepas de *Streptococcus* del grupo *mutans* presentes en binomios madre–hijo. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. 2010; 21 (2): 177 - 186
26. Caufield, P. W., Cutter, G. R., & Dasanayake, A. P. (1993). Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*. 1993; 72(1): 37-45
27. Berkowitz RJ. *Mutans streptococci: acquisition and transmission*. *Pediatric dentistry*. 2006;28(2):106–109

28. Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *Journal of Oral Science*. 2005;47(2):59–64.
29. Ramoz y Brañez en su artículo sobre: STREPTOCOCCUS SANGUINIS Y ACTINOMYCES VISCOSUS BACTERIAS PIONERAS EN LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DENTAL. Disponible en:
<http://www.aulavirtualusmp.pe/ojs/index.php/RevKiru0/article/viewFile/1014/814%20http://www.uniprot.org/proteomes/UP000002148>
30. Matthew B. Lohse, megha Gulati, Alexander D. Johnson y y Clarissa J. Nobile. El desarrollo y la regulación de una o varias especies *Candida albicans* biopelículas. *Nat Rev Microbiol*. 2018 enero; 16 (1): 19-31. doi: 10.1038 / nrmicro.2017.107.
31. CCM Salud. Fichas prácticas. Fichas de Salud. [Internet]. Disponible en: <https://salud.ccm.net/faq/7819-que-es-candida-albicans>.
32. Databio. Ficha de agentes biológicos. [Internet]. Disponible en: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Candida%20albicans.pdf>
33. Delfina Olea Barrionuevo. Presencia de *Candida albicans* y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH. Editorial de la Universidad de Granada, 1995.

34. Sandra Margarita Cruz Quintana. Genoma de *Candida albicans* y resistencia a las drogas. Revista Científica Salud Uninorte, Vol 33, No 3, 2017.
35. José Antonio Sánchez Hernández, León González Beléna, Karla Rojas Valderrama, Guillermo Muñoz Zuritab. Prevalencia de *Candida albicans* y su relación con cambios en el pH vaginal. Volume 24, Issue 1, January–March 2017.
36. Thompson W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1° Edición. Barcelona: Editorial Blume; 1981: 119.
37. Safavi K, Nichols C. Alteration of biological properties of bacterial LPS by calcium hydroxide treatment. JOE 1994 Mar; 23(3): 127-129.
38. Duraffourd C, D' hervicourt L, Lapraz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1° edición. París: editorial Masson SA; 1983
39. Diccionario de botánica. Editorial labor S.A. Barcelona – España. 1979.
40. Look de ugaz, O “Investigación fitoquímica”. Métodos en el estudio de productos naturales PUCP Fondo editorial 1988.
41. Strasburger E, Noll E, Schenk H. Tratado de Botánica. 7° edición: ediciones Marin Barcelona - España 1978.
42. 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.

43. Morales A. Estudio de la extracción y características de los aceites esenciales de *M. Mollis* y de *S. Sagittata* (hierba buena). Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNALM; 1973.
44. Marques AMC. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de soluções irrigadoras à base de clorexidina em diferentes concentrações sobre microorganismos freqüentemente encontrados no canal radicular. Estudo in vitro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia Salvador; 1997.
45. Agapito T. y Sung I. Fito Medicina 110 Plantas Medicinales. 1° edición. Lima: Editorial Isabel IRL; 2003.
46. Goldsmith J. Thorpe's Dictionary of applied Chemistry. 10° Edición. Londres: Editorial Sir Ian Heilbron; 1967(8): 658.
47. Miller E. Fisiología Vegetal. 1° Edición. México D.F.: Editorial Centro Regional de Ayuda Técnica; 1967: 111-114.
48. Meyer L. Introducción a la Fisiología Vegetal. 3° Edición. Buenos Aires: Editorial EUDEBA; 1970: 272.
49. Guenter M. The essential Oils. 1° Edición. New York: Editorial D. Van Nostrand company; 1960.
50. Ricse C. Contribución al estudio de la esencia de *Minthostachys setosa* epl. Tesis de bachiller para Químico. Lima: UNMSM; 1962.
51. Love M. Regional variation in root dentinal tubule infection by *Streptococci gordonii*. JOE 1996 Jun; 2(6): 91-93.

52. Kakrani K, Nai V. Antibacterial and antifungal activity of volatile oil from the seeds of *Aglaia odoratissima*. *Fitoterapia* 1982; 53: 107-109.
53. Motle P. Proyecto de factibilidad para la instalación de una planta de extracción de aceite esencial de Menta. Tesis de bachiller. Lima: UNI; 1977.
54. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica. 1° edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999. p: 203 215
55. Brooks G, Butel J, Ornston N. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 15° edición. México: Editorial Manual Moderno; 1996.
56. Peredo-Luna HA, Palou-Garcia E, Lopez-Malo A. Aceites esenciales: métodos de extracción. *TSIA*. 2009;3(1):24-32.
57. Martínez Benítez, H. L., Mayorga Burgos, L. P. Implementación de un sistema para el mantenimiento de cepas de bacterias en el laboratorio de microbiología de la Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. [Tesis de pregrado]. Bogotá, Universidad Distrital Francisco José de Caldas; 2013.
58. Kannan S, Parimala B, Jayakar B. In – Vitro antibacterial activity of various extracts on leaves of *Passiflora mollissima*. *J Chem Pharm Res*. 2010; 2(5): 225 – 228.
59. Manurung L , Riyanti E, Chemiawan E, Hemiawati M, Gartika M. MIC, MBIC, MBEC Analyses of Garlic Extract (*Allium sativum*) from Indonesian Variety

Against *Streptococcus mutans*. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2017; 16 (1): 1 – 6.

60. Chavan SD, Shettyb NL, Kanuric M. Comparative Evaluation of Garlic Extract Mouthwash and Chlorhexidine Mouthwash on Salivary *Streptococcus mutans* Count—An In Vivo Study. *Oral Health & Preventive Dentistry*. 2010; 8(4): 369 – 374.

61. Houshmand B, Mahjour F, Dianat O. Antibacterial effect of different concentrations of garlic (*Allium sativum*) extract on dental plaque bacteria. *Indian Journal of Dental Research*. 2013; 24(1): 71 – 75.

62. Nirwana I, Agustantina TH, Asymal A. Antifungal Activity of Freshly Squeezed Garlic as Denture Cleanser on *Candida Albicans* Growth. *Journal of International Dental and Medical Research*. 2018;11(2): 639 – 642.

Anexo 1: Carta de Presentación



Pueblo Libre, 04 de octubre de 2018

Dra. CARMEN LUISA AQUIJE DAPOZZO
Jefa De Laboratorio de la UAP

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a usted para expresarle mi respetuoso saludo y al mismo tiempo presentarle al Bachiller CHAVARRI PORTILLA, JOSE DANIEL, con código 2012152586, de la Escuela Profesional de Estomatología - Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud - Universidad Alas Peruanas, quien necesita recabar información en el área que usted dirige para el desarrollo del trabajo de investigación (tesis).

TÍTULO: "EVALUACIÓN INVITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ALLIUM SATIVUM (AJO) SOBRE CEPAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC25125), STREPTOCOCCUS SANGUINIS (ATCC10558) Y CANDIDA ALBICANIS (ATCC 10231)"

A efectos de que tenga usted a bien brindarle las facilidades del caso,

Anticipo a usted mi profundo agradecimiento por la generosa atención que brinde al presente.

Atentamente,

UAP UNIVERSIDAD
ALAS PERUANAS
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
Escuela Profesional de Estomatología

Dra. MIRIAM DEL ROSARIO VASQUEZ SEGURA
DIRECTORA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Anexo 2: Constancia de desarrollo de la investigación



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Pueblo Libre, 28 de junio del 2019

CONSTANCIA DE EJECUCION DEL PROYECTO DE INVESTIGACION

Dra. MYRIAM OCAMPO GUABLOCHE
DIRECTORA DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA

Al Sr **JOSE DANIEL CHAVARRY PORTILLA**, Bachiller de la Escuela Profesional de Estomatología, de Código 2012152586

Quien ha realizado la ejecución y recolección de datos de la investigación titulada:

“EVALUACIÓN INVITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ALLIUM SATIVUM (AJO) SOBRE CEPAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175), STREPTOCOCCUS SANGUINIS (ATCC10556) Y CANDIDA ALBICANS (ATCC 10231)”

Demostrando responsabilidad en el desarrollo de la investigación para la obtención del Título Profesional de Cirujano Dentista, bajo la supervisión del Director Asesor Mg CD Eloy Gamboa Alvarado y mi persona Mg Carmen Luisa Aquije Dapozzo en mi condición de Jefa de Laboratorio de la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud de la Universidad Alas Peruanas.

Se otorga la presente constancia para los fines que el interesado considere conveniente.


UAP UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

MG. BLGO. CARMEN AQUIJE DAPOZZO
JEFA DEL LABORATORIO CENTRAL
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIA DE LA SALUD

ANEXO 3: Ficha de Recolección de Datos



FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

N° de Ficha: _____

Fecha: _____

Nombre del Investigador: _____

Microorganismo estudiado: _____

Observaciones: _____

Medio de cultivo usado:

- Agar Sangre ()
- Agar Sabouraud ()
- Agar TSA ()

Técnica de siembra usada: _____

Cultivo positivo: Si () No ()

Agente antimicrobiano a evaluar: _____

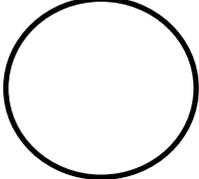
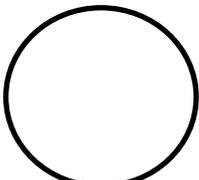
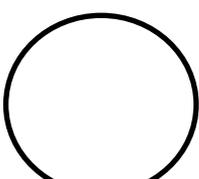
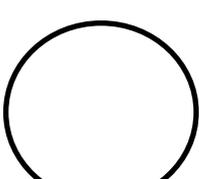
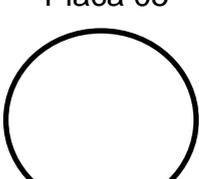
Temperatura de cultivo: _____

Tiempo de cultivo: _____

Presencia de halos de inhibición: Si () No ()

Número de halos: _____

Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de *Allium sativum*

Esquema	Concentración del Agente	Presencia de Halo de Inhibición	Medida (mm)
Placa 01 	100% () 75% () 50% () 25% ()	Si () No () Si () No () Si () No () Si () No ()	_____ _____ _____ _____
Placa 02 	100% () 75% () 50% () 25% ()	Si () No () Si () No () Si () No () Si () No ()	_____ _____ _____ _____
Placa 03 	100% () 75% () 50% () 25% ()	Si () No () Si () No () Si () No () Si () No ()	_____ _____ _____ _____
Placa 04 	100% () 75% () 50% () 25% ()	Si () No () Si () No () Si () No () Si () No ()	_____ _____ _____ _____
Placa 05 	100% () 75% () 50% () 25% ()	Si () No () Si () No () Si () No () Si () No ()	_____ _____ _____ _____

ANEXO 04: MATRIZ DE CONSISTENCIA

EVALUACION INVITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE Allium sativum (AJO) SOBRE CEPAS DE Streptococcus mutans (ATCC25175), Streptococcus sanguinis (ATCC10556) Y Candida albicans (ATCC 10231)

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables de estudio	Metodología de la investigación
<p>Problema General: ¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Allium sativum (ajo) sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175), Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) y Candida albicans (ATCC 10231)?</p> <p>Problemas específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • ¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Allium sativum (ajo) en diferentes concentraciones sobre cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25125)?. • ¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Allium sativum (ajo) en diferentes concentraciones sobre cepa de Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) ?. • ¿Cuál es el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Allium sativum (ajo) en diferentes concentraciones sobre cepa de Candida albicans (ATCC 10231)? 	<p>Objetivo general Comparar el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Allium sativum (ajo) sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25125), Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) y Candida albicans (ATCC 10231)?</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Comparar el efecto antimicrobiano in vitro y determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de Allium sativum (ajo) sobre cepa de Streptococcus mutans (ATCC 25125)?. • Comparar el efecto antimicrobiano in vitro y determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de Allium sativum (ajo) sobre cepa de Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) ?. • Comparar el efecto antimicrobiano in vitro y determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de Allium sativum (ajo) sobre cepa de Candida albicans (ATCC 10231)? 	<p>Hipótesis General</p> <p>El aceite esencial de Allium sativum presenta efecto antimicrobiano in vitro sobre cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25125), Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) y Candida albicans (ATCC 10231)</p> <p>Hipótesis Específicas</p> <p>H1: Existe diferencias estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de Allium sativum sobre Streptococcus mutans (ATCC 25125) H2: Existe diferencias estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de Allium sativum sobre Streptococcus sanguinis (ATCC 10556). H3: Existe diferencias estadísticamente significativa de las diferentes concentraciones del aceite esencial de Allium sativum sobre Candida albicans (ATCC 10231)</p>	<p>Variable Independiente</p> <p>Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de Allium sativum.</p> <p>Variable Dependiente</p> <p>Cepas microbianas: Streptococcus mutans (ATCC 25125), Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) y Candida albicans (ATCC 10231)</p>	<p>Tipo de estudio:</p> <p>Experimental In vitro, prospectivo, transversal y comparativo.</p> <p>Muestra</p> <p>Cepas cultivadas de microorganismos comúnmente encontrados en la cavidad oral: Streptococcus mutans (ATCC 25125), Streptococcus sanguinis (ATCC 10556) y Candida albicans (ATCC 10231)</p>

ANEXO 5: Tamaño Muestral



DETERMINACION DE TAMAÑO MUESTRAL

COMPARACION DE MEDIAS

Tamaño muestral

```
. sampsi 24.06 28.8, sd1(1.29) sd2(2.31) alpha(0.05) power(.80)
```

Estimated sample size for two-sample comparison of means

Test Ho: $m_1 = m_2$, where m_1 is the mean in population 1
and m_2 is the mean in population 2

Assumptions:

```
alpha = 0.0500 (two-sided)
power = 0.8000
m1 = 24.06
m2 = 28.8
sd1 = 1.29
sd2 = 2.31
n2/n1 = 1.00
```

Estimated required sample sizes:

```
n1 = 3
n2 = 3
```


ANEXO 6: Certificado de taxonomía del *Allium sativum*



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N°152-USM-2019

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (bulbo), recibida de **José Daniel Chavarri Portilla**; estudiante de la Universidad Alas Peruanas; ha sido estudiada y clasificada como: ***Allium sativum* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: LILIOPSIDA

SUB CLASE: LILIIDAE

ORDEN: LILIALES

FAMILIA: LILIACEAE

GENERO: *Allium*

ESPECIE: *Allium sativum* L.

Nombre vulgar: "Ajo"
Determinado por: Mg. María Isabel La Torre.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 08 de mayo de 2019




Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

ANEXO 7: Certificado de elaboración del aceite esencial del *Allium sativum*

Constancia

Por la presente dejamos constancia de haber realizado el proceso de destilación de aceite esencial de Ajo (*Allium sativum*) usando la técnica de arrastre con vapor con un alambique en el taller laboratorio del Instituto de Aromaterapia a pedido y en colaboración del bachiller **CHAVARRI PORTILLA JOSE DANIEL** que se encuentra elaborando la Tesis "EVALUACIÓN INVITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE *Allium sativum* (AJO) SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* (ATCC25125), *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556) y *Candida albicans* (ATCC10231)", Bachiller en Cirujano Dentista de la UNNERSIDAD ALAS PERUANAS.

Para el proceso de destilación se utilizó un alambique de capacidad de 10 litros de agua colocando 1.6 Kg. De ajo pelado y cortado. El tiempo de cocción fue de 75 minutos obteniendo 2 litros de agua floral de ajo y 2 ml. De aceite esencial de ajo.

Se remite el presente documento para los fines que el interesado crea conveniente.

Atentamente


MBA Bach. Ing. Pamela Ruiz
Directora
Instituto de Aromaterapia
Calle San Martín 432 Ofic. 202 Miraflores. Lima.
Teléf. 243-2079



ANEXO 8: Certificado de cepa Streptococcus mutans (ATCC 25175)



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-26** Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2020/2/29 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L Bowman Release Date: 2018/3/13
--	--

Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	Performance	Medium: SBAP
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains	Method: Gram Stain (1)	

ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative
	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

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.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologica, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

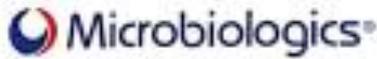
Sample Name: Streptococcus mutans
 Sample Description: 0266
 Sample ID: 266-26
 Sample Creation Date/Time: 2018-03-08T11:58:23.608 cs
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D1 (+++)(A)	266-26	Streptococcus mutans	2.09

Comments:

n/a

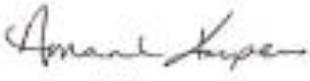
ANEXO 9: Certificado de cepa Streptococcus Sanguinis (ATCC 10556)



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 206-26** Reference Number: ATCC® 25175™** Purity: Pure Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2020/2/29 Release Information: Quality Control Technologist: Mary L Bowman Release Date: 2019/3/13
--	--

Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is pink, circular and translucent.	Performance Medium: SBAP
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominantly in chains	Method: Gram Stain (1)

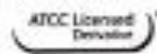
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	---

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

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.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture reference.



(1) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC related marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. It is licensed to use these trademarks and its sell products derived from ATCC cultures.

(2) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Streptococcus mutans
 Sample Description: 0266
 Sample ID: 266-26
 Sample Creation Date/Time: 2018-03-08T11:58:23.608 ca
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D1 (+++)(A)	266-26	Streptococcus mutans	2.00

Comments:

n/a

ANEXO 10: Certificado de cepa *Candida albicans* (ATCC 10231)



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-860** Reference Number: ATCC® 10231™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2020/4/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2018/5/30
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydospore production: positive <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

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.

▲ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) 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.

(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Candida albicans
 Sample Description: 0443
 Sample ID: 443-860
 Sample Creation Date/Time: 2018-05-24T13:19:33.672KN
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

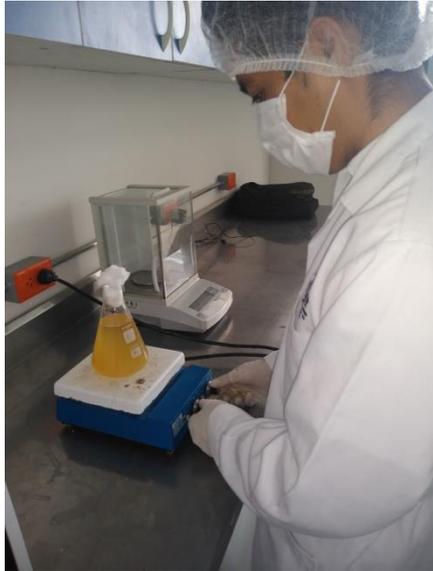
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A10 (+++)(B)	443-860	Candida albicans	2.07

Comments:

N/A

ANEXO 11: Fotos de la Investigación

Preparación de Medios de cultivo:



Mezcla medio de cultivo con H₂O_d en agitador magnético



Verificación de fase de Medio de cultivo



Preparación de medio de cultivo para autoclavado



Autoclavado de medio de cultivo.

Reactivación de las Cepas Microbianas



e mesa de
reactivación de

Siembra de inóculo de cepas
en medios de cultivo



Cepas reactivadas son
colocadas en incubadora.



Incubación de cepas
reactivadas

Preparación de Inóculo y siembra de Cepas Microbianas



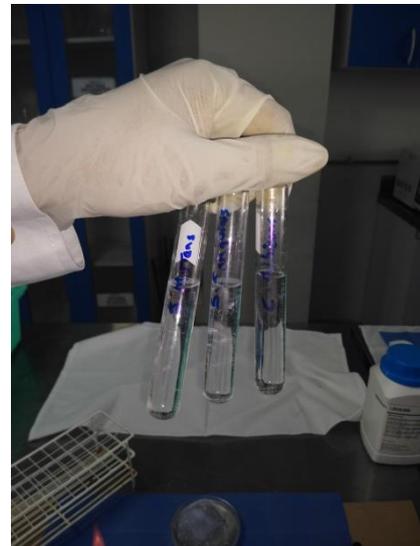
Preparación de mesa de trabajo



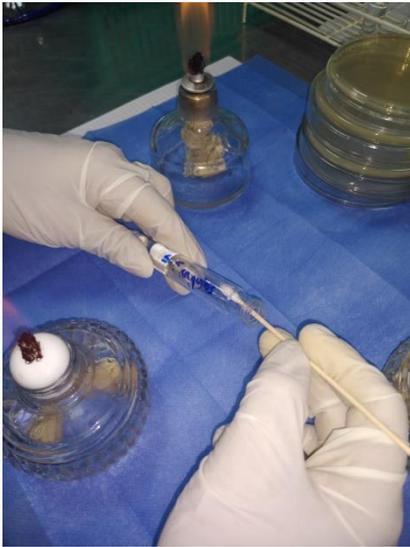
Toma de colonias de cepas reactivadas para inóculo.



Dispersión de colonias de cepas reactivadas en CINA 0.9%



Inóculos de cepas reactivadas a 0.5 macFarland.



Toma de inóculo de cepas con hisopo estéril.



Toma de inóculo de cepas con hisopo estéril.



inóculo de cepas con hisopo estéril.

Siembra por difusión en placas con agar Müllen Hinton



Efecto Antimicrobiano de Aceite Esencial de *Allium sativum* (Ajo)



Extracción de micropipeta de aceites esenciales de ajo a diferentes concentraciones.



Colocación de AE en discos de papel filtro estériles.

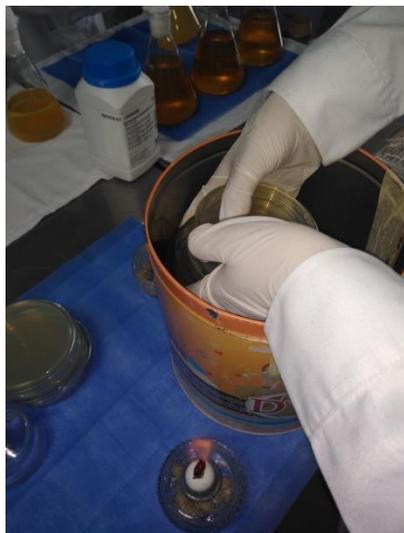


Se coloca 10 μ l de AE en cada disco estéril.



Se colocan los discos con el AE a diferentes concentraciones en los medios sembrados con las cepas microbianas

Se colocan los discos embebidos con el AE a diferentes concentraciones en los medios sembrados con las cepas microbianas



Se colocan las placas con discos en el recipiente para anaerobiosis



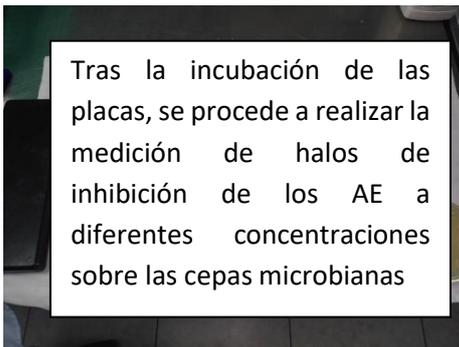
Se sella herméticamente el recipiente en anaerobiosis



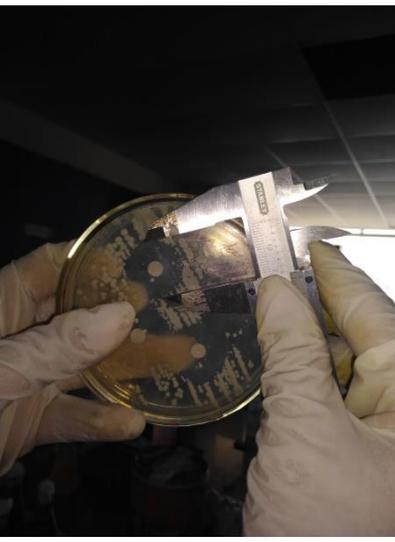
Recipiente sellado completamente



Recipiente en incubadora a 37°C por 48 horas.



Se coloca 10 µl de AE en cada disco estéril.



Se miden los halos de inhibición con un vernier.



Toma de resultados del efecto antimicrobiano del AE a diferentes concentraciones sobre las cepas microbianas.

