

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro*
ENTRE EL EXTRACTO DE *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” Y LA
CLORHEXIDINA AL 0.12% EN CEPAS DE *Streptococcus mutans*
ATCC 25175, AREQUIPA 2017.**

Tesis presentada por el Bachiller:
ADOLFO BÁRCENA PFARA
para optar el Título Profesional de:
Cirujano Dentista

AREQUIPA – PERÚ
2018

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso cuyo nombre es Jehová (Sal. 83:18). Que me permite llegar a él, por el único medio, nuestro señor Jesucristo (1 Ti. 2:5). Por su amor, misericordia, bondad, sabiduría, haberme dado la existencia y la salud. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar mucho más cada momento de la vida y poder realizar las cosas importantes con constancia (2 Ti. 1:7).

A mis padres Félix y Melchora, a quienes amo y admiro mucho, por su dedicación de brindarme siempre su apoyo, comprensión y sabiduría, ejemplos vivos de perseverancia y constancia.

A mi hermana Ubaldina y a mis hermanos Oscar y Ronal por el apoyo y el afecto que me dieron y pueden darme cada uno a su manera.

A los hermanos(as) de la fe, quienes me animaron a no rendirme en sentido espiritual.

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud Escuela Profesional de Estomatología de la Universidad Alas Peruanas Filial – Arequipa; por brindarme todas las facilidades durante el desarrollo y la ejecución de la tesis.

A mi asesor Mg. Wilbert Calizaya Chiri docente del Dpto. de Estomatología Preventiva y Servicio a la Comunidad I y II de la Universidad Alas Peruanas Filial – Arequipa; quien me brindó la asesoría y su apoyo durante la realización de mi tesis.

A la Mg. Flora Yvonne Chávez Salas docente del Dpto. de Microbiología y Parasitología General y Estomatológica de la Universidad Alas Peruanas Filial – Arequipa; ¡muchas gracias! por su asesoría y ayuda altruista en los procedimientos de microbiología.

Al Dr. Xavier Sacca Urday docente del Dpto. de Seminario de Tesis I y II de la Universidad Alas Peruanas Filial – Arequipa; por brindarme la interpretación estadística de mis resultados y asesoría para el desarrollo de la tesis.

Al Ing. Elmer Aliaga encargado del Dpto. de los Laboratorios de Ciencias Naturales de la Universidad Alas Peruanas Filial – Arequipa; por el gesto de amabilidad, comprensión en cuanto al uso de los laboratorios, materiales y equipos de laboratorio.

A la Ing. Edith encargada del Dpto. de entrega de Aulas para los Laboratorios de Ciencias Naturales de la Universidad Alas Peruanas Filial – Arequipa; por la paciencia, comprensión.

A la Señorita Katty, Praxi, y la señora Nancy, asistentes del Dpto. de los Laboratorios de Ciencias Naturales de la Universidad Alas Peruanas Filial – Arequipa; por su aguante hacia mi persona, ya que vez tras vez solicitaba materiales y ahí siempre disponibles para ayudar.

RESUMEN

Objetivo: Comparar la actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” y la Clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Métodos: El estudio fue experimental *in vitro*, se utilizó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, la cual se reactivó sembrándola en caldo Brain Heart Infusión (BHI); una vez reactivada, se sembró en agar Müller-Hinton en 21 placas de Petri; sobre el cual se colocó discos de papel filtro impregnados con el extracto de la “Jarilla” con las siguientes concentraciones: 7.8 mg/ml, 15.6 mg/ml, 31.2 mg/ml, 125 mg/ml, 250 mg/ml; con clorhexidina al 0.12% (control positivo) y con glicerina (control negativo). También se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en caldo BHI, y en agar Nutritivo se halló la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Resultados: El extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” al 7.8 mg/ml produjo una media de 8.44 mm de halo de inhibición, al 15.6 mg/ml produjo una media de 11.8 mm de halo de inhibición, al 31.2 mg/ml produjo una media de 12.88 mm de halo de inhibición, al 125 mg/ml produjo una media de 16.35 mm de halo de inhibición y al 250 mg/ml produjo una media de 18.26 mm; con respecto a la clorhexidina al 0.12% produjo una media de 12.39 mm de halo de inhibición y con respecto a la glicerina no presenta actividad antibacteriana. La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) fue de 0.97 mg/ml y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) fue de 3.90 mg/ml.

Conclusiones: El extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” a las concentraciones de 125 mg/ml y 250 mg/ml, tuvieron mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina al 0.12%.

Palabras Claves: Actividad antibacteriana, *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”, clorhexidina, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Objective: To compare the antibacterial activity *in vitro* between the extract of *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" and Chlorhexidine at 0.12% in strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Methods: The study was experimental *in vitro*, the strain of *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was used, which was reactivated by sowing it in Brain Heart Infusion broth (BHI); once reactivated, it was seeded on Müller-Hinton agar in 21 Petri dishes; on which filter paper discs impregnated with the extract of the "Jarilla" were placed with the following concentrations: 7.8 mg / ml, 15.6 mg / ml, 31.2 mg / ml, 125 mg / ml, 250 mg / ml; with 0.12% chlorhexidine (positive control) and with glycerin (negative control). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in BHI broth was also determined, and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was found in nutritive agar.

Results: The extract of *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" at 7.8 mg / ml produced an average of 8.44 mm of inhibition halo, at 15.6 mg / ml produced an average of 11.8 mm of inhibition halo, at 31.2 mg / ml produced an average of 12.88 mm of inhibition halo, at 125 mg / ml produced an average of 16.35 mm of inhibition halo and at 250 mg / ml produced an average of 18.26 mm; with respect to chlorhexidine at 0.12%, it produced an average of 12.39 mm of inhibition halo, and with respect to glycerin it does not present antibacterial activity. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was 0.97 mg / ml and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was 3.90 mg / ml.

Conclusions: The extract of *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" at concentrations of 125 mg / ml and 250 mg / ml, had better antibacterial effect than chlorhexidine at 0.12%.

Key Words: Antibacterial activity, *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla", chlorhexidine, *Streptococcus mutans*.

ÍNDICE

PORTADA	I
DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
INTRODUCCIÓN	XII
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	2
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	5
1.4.1. Importancia de la investigación.....	5
1.4.2. Viabilidad de la investigación.....	6
1.4.2.1. Recursos humanos.....	6
1.4.2.2. Recursos financieros.....	6
1.4.2.3. Recursos de materiales.....	6
1.4.2.4. Recursos de equipos.....	8
1.4.2.5. Recursos institucionales.....	8
1.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	8

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	10
2.1.1. Antecedentes Internacionales.....	10
2.1.2. Antecedentes Nacionales	12
2.1.3. Antecedentes Locales	12
2.2. BASES TEÓRICAS	13
2.2.1. Fitoterapia	13
2.2.2. Planta medicinal	13
2.2.3. <i>Larrea</i>	13
2.2.3.1. Especies.....	13
2.2.4. <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla”	14
2.2.4.1. Clasificación taxonómica	14
2.2.4.2. Etimología	14
2.2.4.3. Descripción botánica	14
2.2.4.4. Hábitat.....	16
2.2.4.5. Usos tradicionales	16
2.2.4.6. Usos científicamente comprobados	17
2.2.4.7. Contraindicaciones	17
2.2.4.8. Dosis recomendada.....	17
2.2.5. Extracción del principio activo.....	17
2.2.5.1. Extracción por Soxhlet.....	18
2.2.6. Clorhexidina	20
2.2.6.1. Descripción	20
2.2.6.2. Propiedades	21
2.2.6.3. Mecanismo de acción.....	22
2.2.6.4. Presentaciones.....	24
2.2.7. <i>Streptococcus mutans</i>	25

2.2.7.1. Clasificación	25
2.2.7.2. <i>Streptococcus mutans</i> y grupo mutans.....	25
2.2.7.3. Descripción	26
2.2.7.4. Estructura celular	26
2.2.7.5. Factores de virulencia	27
2.2.7.6. Hábitat.....	28
2.3. DEFINICIÓN DE LOS TÉRMINOS BÁSICOS.....	28
CAPÍTULO III: HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN	30
3.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS PRINCIPAL Y DERIVADAS	31
3.1.1. Hipótesis principal	31
3.1.2. Hipótesis derivada	31
3.2. VARIABLES; DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL	31
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA	32
4.1. DISEÑO METODOLÓGICO.....	33
4.1.1. Tipo de estudio	33
4.1.2. Diseño de investigación.....	33
4.1.2.1. De acuerdo a la temporalidad.....	33
4.1.2.2. De acuerdo al lugar de recolección de datos	33
4.1.2.3. De acuerdo al momento de la recolección.....	33
4.1.2.4. De acuerdo a la finalidad investigativa	33
4.2. DISEÑO MUESTRAL.....	33
4.2.1. Criterios de inclusión	34
4.2.2. Criterios de exclusión.	34
4.3. TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	34
4.3.1. Procesamiento del material vegetal	34
4.3.1.1. Obtención de la planta.....	34
4.3.1.2. Estabilización	34

4.3.1.3. Molienda y empaquetamiento.....	34
4.3.2. Método de obtención del extracto.....	35
4.3.2.1. Extracción por Soxhlet.....	35
4.3.2.2. Determinación del Rendimiento de la Extracción.....	35
4.3.2.3. Procedimiento	35
4.3.3. Preparación del material microbiológico	36
4.3.3.1. Obtención del <i>Streptococcus mutans</i>	36
4.3.3.2. Activación de las cepas bacterianas	36
4.3.3.3. Coloración Gram	36
4.3.4. Evaluación de la actividad antibacteriana	37
4.3.4.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ...	37
4.3.4.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)	38
4.3.4.3. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana	39
4.4. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	40
4.5. ASPECTOS ÉTICOS.....	40
CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO	42
5.2. ANÁLISIS INFERENCIAL	58
5.3. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS	61
5.3.1. Hipótesis principal	61
5.3.2. Hipótesis derivada	61
5.4. DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
FUENTES DE INFORMACIÓN.....	65
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” sobre cepas de <i>S. mutans</i>	42
TABLA N° 2: Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” sobre cepas de <i>S. mutans</i>	43
TABLA N° 3: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de la clorhexidina al 0.12% en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	44
TABLA N° 4: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	46
TABLA N° 5: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 7.8 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	48
TABLA N° 6: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 15.6 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	50
TABLA N° 7: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 31.2 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	52
TABLA N° 8: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 125 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	54
TABLA N° 9: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 250 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	56
TABLA N° 10: Prueba de análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de las concentraciones del extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” sobre el <i>Streptococcus mutans</i>	58
TABLA N° 11: Prueba t de Student para comparar la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con las concentraciones del extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” sobre el <i>Streptococcus mutans</i>	59

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de la clorhexidina al 0.12% en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	45
GRÁFICO N° 2: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	47
GRÁFICO N° 3: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 7.8 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	49
GRÁFICO N° 4: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 15.6 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	51
GRÁFICO N° 5: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 31.2 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	53
GRÁFICO N° 6: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 125 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	55
GRÁFICO N° 7: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> entre el extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla” de 250 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	57

INTRODUCCIÓN

La caries es una enfermedad infecciosa y transmisible de los dientes, que se caracteriza por la desintegración progresiva de sus tejidos calcificados, debido a la acción de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta. Como resultado se produce la desmineralización de la porción mineral y la disgregación de su parte orgánica, referentes consustanciales de la dolencia.¹

El principal microorganismo que da inicio y progresión a la caries dental es el *Streptococcus mutans* ya que produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido fórmico cuando metabolizan carbohidratos fermentables como sacarosa, glucosa y fructuosa. Estos ácidos circulan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte (desmineralización dentaria).²

La clorhexidina, como enjuague, tiene un excelente efecto antibacteriano contra los *Streptococcus mutans*;³ es genotóxico para las células epiteliales a medida que aumenta la duración de uso.⁴ Por este motivo numerosos trabajos de investigación están proponiendo el uso de productos naturales por sus propiedades antibacterianas frente a los *Streptococcus mutans*.^{5,6,7,8} Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 80% de la población mundial utiliza algún tipo de medicina alternativa o la fitoterapia que tiene como definición el uso de plantas naturales con fines terapéuticos.⁹ En ese sentido el Perú es un país privilegiado ya que posee una gran variedad de especies vegetales con propiedades medicinales.¹⁰ Así como en toda América, de hecho, algunos estudios señalan propiedades de plantas para problemas en específico.¹¹

La planta *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" contiene propiedades antibacterianas, antimicóticos, antiinflamatorios y antitumorales.¹² Sin embargo, sus propiedades y su relevancia clínica en el uso odontológico no han sido estudiadas.

Por lo tanto, el propósito del presente estudio es comparar la actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. Jarilla y la clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

CAPÍTULO I:
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2004 declaró que las enfermedades bucodentales, como la caries dental, es un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y, cada vez con mayor frecuencia, a los países en desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres. Al anunciar las conclusiones del informe mundial sobre salud bucodental, la OMS ha declarado que se estima que cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental. «En todo el mundo se considera que la pérdida de dientes es consecuencia natural del envejecimiento, pero, en realidad, puede prevenirse». «Existe la idea de que la caries dental ha dejado de ser un problema en los países desarrollados, cuando en realidad afecta a entre el 60% y el 90% de la población escolar y a la gran mayoría de los adultos. La caries dental es también la enfermedad bucodental más frecuente en varios países asiáticos y latinoamericanos.»¹³ En abril del 2012 señaló la OMS que, en términos mundiales, entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar y cerca del 100% de los adultos tienen caries dental, a menudo acompañada de dolor o sensación de molestia.¹⁴

En México se publicó en el 2004 una investigación sobre la relación que existe entre los niveles de *Streptococcus mutans* y caries dental; en este estudio se determinó la prevalencia de caries dental en un grupo de niños escolares de edades entre 10-13 años que pertenecen a una escuela de la zona urbana de la ciudad de Zacatecas, se demostró cuantitativamente que existe una relación entre la presencia de un número alto de unidades formadoras de colonia de *S. mutans* y la presencia de caries dental, se estimó la prevalencia para este grupo con un valor del 56%, que la presencia de caries es proporcionalmente mayor en el grupo de niñas y la acumulación de la placa sumada a la presencia de una cantidad importante de *S. mutans* en saliva representan un factor de riesgo para el desarrollo de caries dental.¹⁵

En el año 2012 se publica una revisión sistemática de 32 artículos cuyo objetivo era evidenciar la relación que existe entre la presencia de *Streptococcus mutans* y caries dental; el estudio parece ser concluyente en

que la presencia de *Streptococcus mutans* está relacionada con altos índices de caries y, en consecuencia, puede ser un factor de riesgo para la aparición de nuevas lesiones cariosas.¹⁶

Es evidente que el *Streptococcus mutans* que causa la caries dental sigue siendo un problema de salud oral, así lo evidencian los múltiples estudios.

El antiséptico más empleado para prevenir y combatir a los *Streptococcus mutans* causantes de la caries dental y la formación de placa, es la clorhexidina.

En el año 1997 Joel y Miguel demuestran que el cepillado más la clorhexidina tiene mejor efecto antiplaca que solo usar la clorhexidina individualmente del cepillado.¹⁷

En el año 1999 Camejo realizó un estudio para establecer el efecto antibacteriano de tres enjuagues bucales (sanguinaria, compuesto fenólico y gluconato de clorhexidina) sobre *Streptococcus mutans* en la cual se puede evidenciar al gluconato de clorhexidina (Peridex) como el único enjuague bucal que tuvo efecto antibacteriano sobre los *Streptococcus mutans*.¹⁸

En el año 2006, investigaciones realizadas por Modesto y Drake, muestran que la inhibición importante del crecimiento de *Streptococcus mutans* y la incapacidad siguiente de crecer como placa bacteriana en presencia de sacarosa ocurría después de un régimen de exposición escalonado a clorhexidina inicialmente y luego a xilitol.¹⁹

En el 2007 Naverac y Col. hacen un artículo breve sobre la revisión bibliográfica de los antimicrobianos presentes en los colutorios, su efectividad en el control de placa y sus indicaciones, para que el higienista conozca perfectamente los productos disponibles y pueda aconsejar a los pacientes que demanden su ayuda; en la cual señala que una de las ventajas principales de la clorhexidina, es que, tiene efecto en disminuir la gingivitis en un 45% y la placa dental en un 50-55% el cual presenta efecto

inhibidor significativo en la actividad de las enzimas proteolíticas que generan caries dentinaria.²⁰

Sin embargo, la clorhexidina está catalogada como un agente tóxico con reacciones adversas que pueden perjudicar la salud del paciente con un uso prolongado y desmedido.^{4,21}

Los científicos en la actualidad promueven el uso de la fitoterapia o medicina natural; este es el caso de *Larrea divaricata*, más conocido como “Jarilla hembra”, el cual se encuentra ampliamente distribuido en el noroeste, centro y sudeste de Argentina así como también en las regiones áridas del Perú propios de la costa de los departamentos de Ica, Arequipa (circunscritas en el valle de Majes) y Moquegua; tiene propiedades antibacterianas, antimicóticos, analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales.
12,22,23,24,25

Entonces la principal bacteria que da inicio y progreso de la caries dental, es el *Streptococcus mutans*.²⁶ EL antiséptico más empleado en los tratamientos odontológicos que posee gran efectividad frente a este microorganismo, es la clorhexidina.^{27,28} La planta *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” posee propiedades antibacterianas.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Existirá diferencia en la actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” y la clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175?

1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. Objetivo general

- Comparar la actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” y la Clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) *in vitro* del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” a las concentraciones de 7.8 mg/ml, 15.6 mg/ml, 31.2 mg/ml, 125 mg/ml y 250 mg/ml en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de la clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.4. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1. Importancia de la investigación

En trabajos de investigación precedentes a ésta, se han demostrado que las plantas medicinales tienen principios activos con propiedades antibacterianas que pueden ser utilizados para el control del *Streptococcus mutans* causantes del inicio y progreso de la “caries dental”; la planta medicinal en estudio, también tiene propiedades antibacterianas, así lo señalan los antecedentes y las pruebas piloto previas a la investigación.

Esta investigación es importante porque pretende demostrar que el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” posee actividad antibacteriana frente al *Streptococcus mutans*. Por muchos años se ha empleado la clorhexidina al 0.12% debido a su alta efectividad contra los *Streptococcus mutans*, así mismo este antiséptico tiene sus limitaciones en cuanto a su uso, debido a sus reacciones adversas.

Esta investigación permitirá ampliar la visión en la práctica odontológica ya que se requiere descubrir y aplicar otras soluciones naturales para el tratamiento antibacteriano contra los *Streptococcus mutans* y de esa

manera prevenir la caries dental, problema tan relevante en nuestra sociedad.

1.4.2. Viabilidad de la investigación

La presente investigación fue viable porque se contó con los recursos necesarios para su realización:

1.4.2.1. Recursos humanos

- Investigador : Bach. Adolfo Bárcena Pfora
- Asesor : Mg. Wilbert Calizaya Chiri

1.4.2.2. Recursos financieros

El presente trabajo de investigación fue financiado, en su totalidad, por el investigador.

1.4.2.3. Recursos de materiales

- Mandilón blanco.
- Barbijo.
- Guantes clínicos.
- Gorro clínico.
- Lentes.
- Soporte universal.
- Pinzas para el soporte universal
- Olla
- Base para la cocina eléctrica (mayólica)
- Termómetro ambiental.
- Mortero y pistilo.
- Platos descartables.
- Cuchara analítica.
- Probeta de 10, 100 y 250 ml.
- Beaker de 50, 250 ml.
- Piseta con agua destilada.
- Matraz de 125 ml.

- Espátula de yeso.
- Espátula de cera.
- Bagueta.
- Tubos de ensayo mediano.
- Tubos de ensayo pequeños.
- Gradillas blancas grandes.
- Trípode.
- Rejilla de asbesto.
- Mecheros.
- Encendedor.
- Placas de Petri.
- Asa de Kolle.
- Set de micropipetas.
- Pinzas de algodón.
- Cristal violeta.
- Solución de lugol.
- Alcohol acetona.
- Safranina.
- Aceite de inmersión.
- Porta láminas.
- Porta objeto.
- Papel aluminio.
- Papel kraft.
- Pabilo.
- Hisopos.
- Papel filtro lento y rápido WHATMAN.
- Algodón.
- Frascos de vidrio color caramelo de 250 ml.
- Gasa.
- Guantes quirúrgicos.
- Hojas de la "Jarilla".
- Alcohol de 70°.
- Cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- Caldo Brain Heart Infusión (BHI).

- Agar Mitis Salivarius.
- Agar Nutritivo.
- Agar Müller Hinton.
- Alcohol de 96°.

1.4.2.4. Recursos de equipos

- Estufa
- Equipo de Soxhlet.
- Cocina eléctrica.
- Balanza analítica
- Equipo de destilación.
- Autoclave.
- Refrigeradora.
- Incubadora.
- Microscopio.
- Cámara digital.

1.4.2.5. Recursos institucionales

- Universidad Alas Peruanas Filial - Arequipa.
- GenLab del Perú S.A.C. Tecnologías para la vida.

1.5. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Esta investigación no presentó limitaciones debido que todo el material e instrumentos (recursos) fueron asequibles.

CAPÍTULO II:
MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

No existe ningún archivo, tesis, artículo, publicación e investigación sobre la comparación de la actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” y la Clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175; pero, si existen investigaciones que hablan referentes al tema de esta investigación:

2.1.1. Antecedentes Internacionales

Catiana Zampini Iris, Cudmani Norma, Isla María Inés, ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PLANTAS MEDICINALES ARGENTINAS SOBRE BACTERIAS ANTIBIÓTICO-RESISTENTES, ARGENTINA 2007: Esta investigación demostró que los extractos alcohólicos de *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, y *S. aphylla* (tres de las once especies de plantas ensayadas) fueron las más activas con CIM \leq 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ocasionando diámetros de halos de inhibición en un rango de 1,5 a 2,5 cm sobre las siguientes bacterias: *E. Coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*.²²

Davicino Roberto, Aída Mattar María, Casali Yolanda Angelina, Correa Silvia Graciela, Pettenati Elisa Margarita y Micalizzi Blas, ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS USADAS EN MEDICINA POPULAR EN ARGENTINA 2007: A través de esta investigación se hizo un estudio de 10 extractos de plantas utilizadas en la medicina popular en Argentina en la actividad antifúngica *in vitro* contra 4 cepas de hongos. Se demuestra que el extracto con mayor efecto antifúngico fue el extracto etanólico de *Larrea divaricata*, la cual tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. cereviceae* (CIM de 2,5 mg/ml), *C. albicans* (CIM de 20 mg/ml) y *A. niger* (CIM de 120 mg/ml).²³

Stege PW, Davicino RC, Vega AE, Casali YA, Correa S, Micalizzi B. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS ACUOSOS DE LARREA DIVARICATA CAV (JARILLA) CONTRA HELICOBACTER PYLORI, ARGENTINA 2006: Los resultados de esta investigación muestran que los extractos a base de *Larrea divaricata* Cav. Tuvieron una

actividad inhibitoria de 0.04-0.1 mg/l contra cepas de *H. pylori*. Estos resultados apoyan el uso popular de *Larrea divaricata* Cav. en las alteraciones gástricas y promueven nuevas investigaciones para caracterizar estos compuestos con un potencial terapéutico contra las úlceras gástricas y el cáncer gástrico asociado a *H. pylori*.²⁹

Romero Cintia Mariana, Vivacqua Cristian Germán, Abdulhamid María Belén, Baigori Mario Domingo, Slanis Alberto Carlos, Gaudio de Allori María Cristina, Tereschuk María Laura; ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE BIOFILM DE PLANTAS MEDICINALES TRADICIONALES DEL NOROESTE DE ARGENTINA CONTRA PATÓGENOS NATIVOS Y MICROORGANISMOS AMBIENTALES, ARGENTINA 2016: El objetivo de este estudio fue investigar las actividades antimicrobianas, anti-biofilm y de adhesión celular de plantas nativas (*Larrea divaricata*, *Tagetes minuta*, *Tessaria absinthioides*, *Lycium chilense* y *Schinus fasciculatus*) recolectadas en el noroeste de Argentina frente a 2 cepas bacterianas (*Bacillus licheniformis* y *Staphylococcus sciuri*); pero concentrándonos en la actividad antibacteriana de *Larrea divaricata*, esta planta presentó una CIM para *Bacillus licheniformis* de 250 µg/ml y para *Staphylococcus sciuri* de 31.25 µg/ml según la tabla N° 2 de este artículo.³⁰

Gómez-Cansino Rocio, Guzmán-Guitierrez Silvia, Campos-Lara María Guadalupe, Espitia-Pinzón Clara Ines, Reyes-Chilpa Ricardo; COMPUESTOS NATURALES DE LAS PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS COMO MEDICAMENTOS POTENCIALES PARA LAS DROGAS ANTI-TUBERCULOSIS, MÉXICO 2017: Los autores de este artículo desarrollaron una búsqueda segura de los compuestos naturales de plantas medicinales mexicanas como posibles fármacos antituberculosos; dentro de esta extensa búsqueda bibliográfica de libros publicados, artículos y fuentes electrónicas de información como Pubmed (Medline) y la base de datos BADEPLAM; se halla que la “Jarilla” tiene un efecto antituberculoso con una CIM de 50 µg/ml.³¹

Hapon MV, JJ Boiteux, MA Fernández, G Lucero, MF Silva, PH Pizzuolo, EFECTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN

EXTRACTOS DE PLANTAS ARGENTINAS EN EL CRECIMIENTO MICELIAR DEL FITOPATOGENO *BOTRYTIS CINEREA* PERS. ARGENTINA 2017: El objetivo de este trabajo fue estudiar el valor potencial de cuatro extractos de plantas nativas de Argentina y alguno de sus compuestos fenólicos como biofarmacos sobre *B. cinerea*. En esta investigación Se utilizaron extractos acuosos de cuatro especies nativas argentinas, *Larrea divaricata*, *Prosopis strombulifera*, *Tessaria absinthioides* y *Schinus molle* var. *areira*. En conclusión, los extractos de *P. strombulifera* y *T. absinthioides* no inhibieron el crecimiento miceliar mientras que *S. molle* lo estimulo. *Larrea divaricata* demostró una inhibición superior al 50% con concentraciones de 100 mg/mL de su extracto vegetal.³²

2.1.2. Antecedentes Nacionales

No existe antecedentes Nacionales.

2.1.3. Antecedentes Locales

Cuba Ventura Verónica, Saavedra Sánchez Marylia Alejandrina, EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS DE LARREA DIVARICATA CAV. "JARILLA" FRENTE A CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y STREPTOCOCCUS PYOGENES, AREQUIPA 2011: El extracto etanólico de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" a la concentración de 125 µg/ml para *Staphylococcus aureus* produjo un halo de inhibición de 30 mm, una CIM de 7.8 mg/ml y una CBM de 15.6 mg/ml; y para *Streptococcus pyogenes* a la concentración de 125 µg/ml del extracto de la "Jarilla" produjo un halo de inhibición de 27 mm, una CIM de 15.6 mg/ml y una CBM de 31.3 mg/ml; también se muestra el procedimiento para extraer el extracto etanólico de *Larrea Divaricata* Cav. "Jarilla" por Soxhlet, en la presente investigación también se emplea el mismo método de extracción por Soxhlet, que fue aplicado para el antibiograma frente a los *Streptococcus mutans*.³³

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. Fitoterapia

Se define como la ciencia que estudia el uso de los productos de origen vegetal con finalidad preventiva y de tratamiento. La fitoterapia actual se considera una terapéutica suave, no agresiva, que utiliza principalmente productos con actividad moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios; se considera especialmente útil en el tratamiento de afecciones leves o moderadas, y afecciones crónicas.³⁴

2.2.2. Planta medicinal

Es aquella que tiene propiedades terapéuticas; es un recurso, cuya parte o extractos se emplean como drogas en el tratamiento de alguna afección. El conocimiento empírico acerca de las plantas medicinales y sus efectos curativos se acumuló durante milenios y posteriormente pasó a ser parte integral de sistemas y tradiciones curativas, la cantidad de plantas con propiedades curativas es tal que nadie puede dominar la totalidad del conocimiento de esta materia.³⁵

2.2.3. Larrea

El género *Larrea*, con 5 especies en América, solo una para el Perú (*Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”) propio de la costa de los departamentos de Ica, Arequipa (circunscrita al Valle de Majes) y Moquegua.³⁵

2.2.3.1. Especies

En América se encuentran cinco especies, las cuales se conocen como jarillas:³⁶

- *Larrea ameghinoi* (jarilla rastrera).
- *Larrea nítida* (jarilla fina o jarilla de la sierra)
- *Larrea divaricata* (jarilla hembra).
- *Larrea cuneifolia* (jarilla macho).
- *Larrea tridentada*, conocida como wamis (ubicada al norte de México).

2.2.4. *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”

2.2.4.1. Clasificación taxonómica

Para la clasificación taxonómica de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” se tomó en cuenta la clasificación según Engler:³⁷

Reino:	Plantae
Subreino:	Embriofitas
División:	Embriofitas sifonógamas, espermatofitas, antofitas
Subdivisión:	Angiospermas
Clase:	Dicotiledóneas
Subclase:	Arquiclamídeas
Orden:	Geraniales
Familia:	Zygophyllaceae
Género:	Larrea
Especie:	<i>Larrea divaricata</i> Cav.
Nombre Vulgar:	Jarilla, Yarrilla, Varrilla

2.2.4.2. Etimología

Larrea: nombre genérico que fue nombrado en honor de Juan Antonio Hernández Pérez de Larrea un clérigo español, nacido en Villar del Salz el 30 de septiembre de 1730, amigo de la ciencia, que fue deán del cabildo de Zaragoza y obispo de Valladolid.³⁸

Divaricata: Epíteto latino que significa "extendida".³⁹

2.2.4.3. Descripción botánica

Larrea divaricata Cav. “Jarilla” es una planta fanerógama de la familia Zygophyllaceae, arbustiva anual de tallos leñosos, cilíndricos y resinosos; florece de octubre a fines de noviembre y alcanza hasta casi 2 metros de altura.⁴⁰



Figura N° 1: *Larrea divaricata* Cav. "jarilla"¹²

- **Hojas:** Bifoliadas (con dos folíolos soldados en la base) de color verde.
- **Fruto:** Velloso en forma de cápsula con 5 mericarpos indehiscentes, por el color blanco grisáceo tiene el aspecto de un copo de algodón.
- **Flores:** Actinomorfas o zigomorfas, hermafroditas, solitarias o encimas, tetrámeras o pentámeras, estambres entre 8,10 y 15; presentan ovario súpero 3,5 y 12 locular con 2 o más óvulos por lóculos, estilo simple; estigma entero o cinco lobulado y son de color amarillo.⁴¹



Figura N° 2: Hojas, frutos y flores de *Larrea divaricata* Cav.
"Jarilla"¹²



Figura N° 3: Hojas, frutos y flores de *Larrea divaricata* Cav.
“Jarilla”.

Fuente:http://www.floramendocina.com.ar/clase_3/larrea_divaricata_7283.html

2.2.4.4. Hábitat

Original de América del Sur, ubicándose en la costa de los departamentos de Ica, Arequipa y Moquegua.⁴²

2.2.4.5. Usos tradicionales

- Tradicionalmente se ha utilizado en casos de resfriado, varicela, diarrea, dolor, problemas menstruales y picaduras de serpientes.
- Por vía externa se ha utilizado como antiinflamatorio en el tratamiento de las contusiones, especialmente en caso de hematomas, así como para estimular el crecimiento del cabello.
- Antirreumático, emenagogo, desodorante pédico.
- Antirresfrío, anticatarral, antigripal, expectorante.
- Antiinflamatorio, dermopático, febrífugo, oxiótico, insecticida, antidontálgico, antitusivo.
- Para tratar y prevenir venas varicosas.
- Curar callos y hongos.¹²

2.2.4.6. Usos científicamente comprobados

- Antiinflamatoria durante los procesos artríticos.
- Antioxidante
- Fungicida.
- Actividad analgésica.
- Antitumoral.
- Antibacteriana.¹²

2.2.4.7. Contraindicaciones

- Presenta una muy baja toxicidad, en concentraciones mayores al 3% durante consumos prolongados -como conservante de alimentos- genera quistes en zona cortical y medular del riñón. No debe ser consumido en períodos de embarazo, lactancia, pacientes de hepatitis o niños pequeños.
- A dosis elevadas se ha relacionado con la cirrosis hepática, el cáncer y los quistes renales. No debe tomarse durante mucho tiempo sin indicación profesional. No se recomienda en el embarazo y la lactancia; además, esta planta puede tener algún efecto reductor de la fertilidad.¹²

2.2.4.8. Dosis recomendada

- No ha sido suficientemente documentada para uso interno.
- Se emplea las hojas en cocimiento (30g/l) para uso externo, en forma de baños tibios (hemorroides y transpiración fétida de pies), 2 veces al día.¹²

2.2.5. Extracción del principio activo

La extracción es una técnica de purificación y separación, para separar una sustancia de una mezcla sólida o líquida mediante el uso de un solvente. Los extractos son una buena forma de aprovechar las bondades medicinales de una planta, existen métodos de extracción cuyo objetivo es que a partir del material vegetal y la adición de un solvente adecuado

se logre extraer el principio activo, metabolitos primarios, secundarios, pigmentos entre otros con los que pueda contar una planta.⁴³

La extracción puede clasificarse:

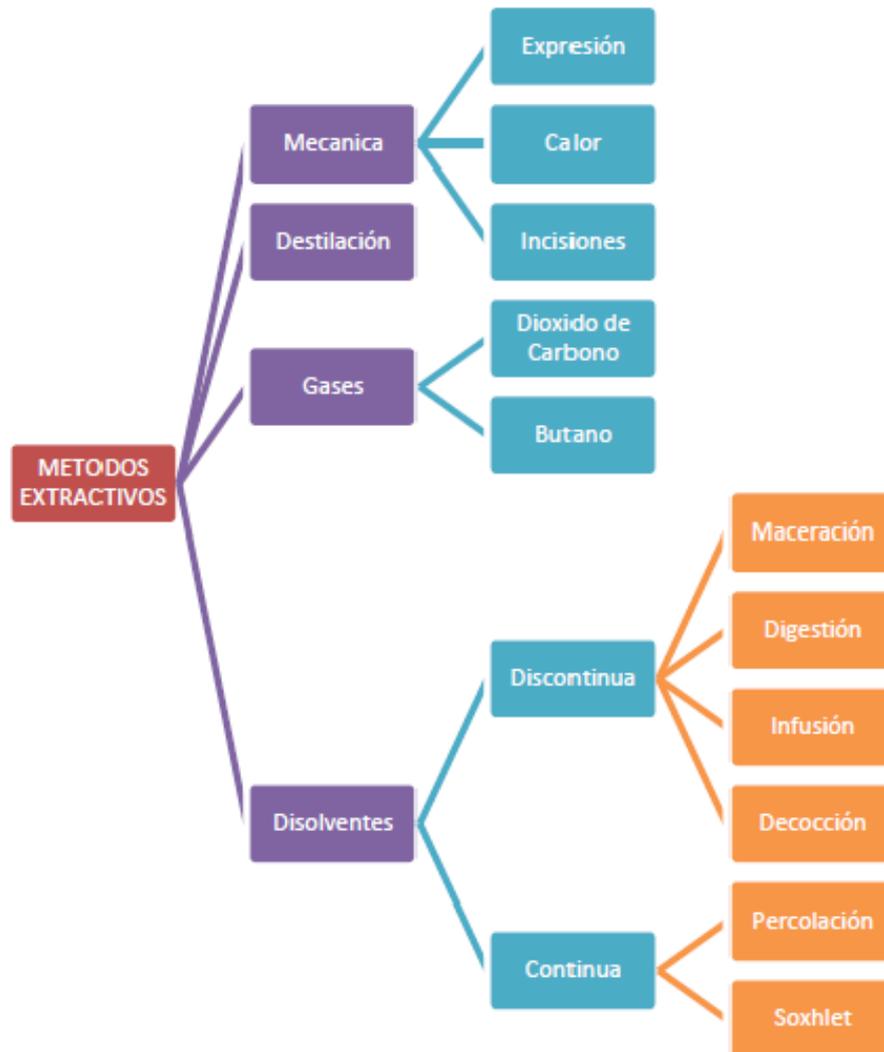


Figura N° 4: Clasificación de métodos de extracción.⁴³

2.2.5.1. Extracción por Soxhlet

Es un sistema cerrado y que permite el flujo del solvente en ciclos. Los equipos de soxhlet constan de tres partes: un reservorio de solvente en la parte inferior, el cual es un balón, donde se coloca el solvente extractor y se somete a ebullición. La segunda parte es un soporte para

el material vegetal el cual se coloca empaquetado en papel filtro. Finalmente se tiene un refrigerante o condensador el cual recibe los vapores del solvente que vienen desde el balón y los condensa para hacer gotear el solvente sobre el material vegetal. Cuando el soporte que mantiene el material vegetal se llena de solvente recién destilado, se activa un sifón que hace que el extracto formado pase al balón donde continua en ebullición. Cada llenada del solvente en el soporte de muestra es un ciclo y pueden repetirse varios ciclos de extracción hasta el agotamiento de la muestra.⁴⁴

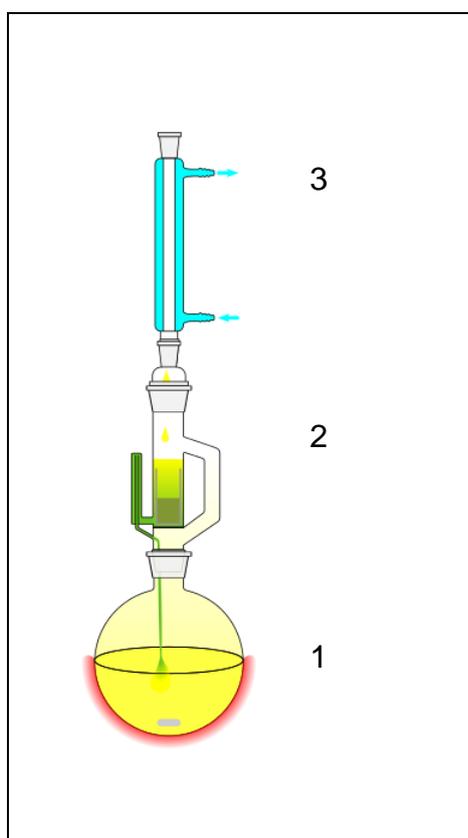


Figura N° 5

1. Balón: Reservorio de solvente.
2. Sifón: Soporte para el material vegetal.
3. Refrigerante o condensador

2.2.6. Clorhexidina

2.2.6.1. Descripción

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, es un dímero proguanil por lo que se dice que es una bisguanida, conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: paraclorofenilbiguanida.^{45,46}

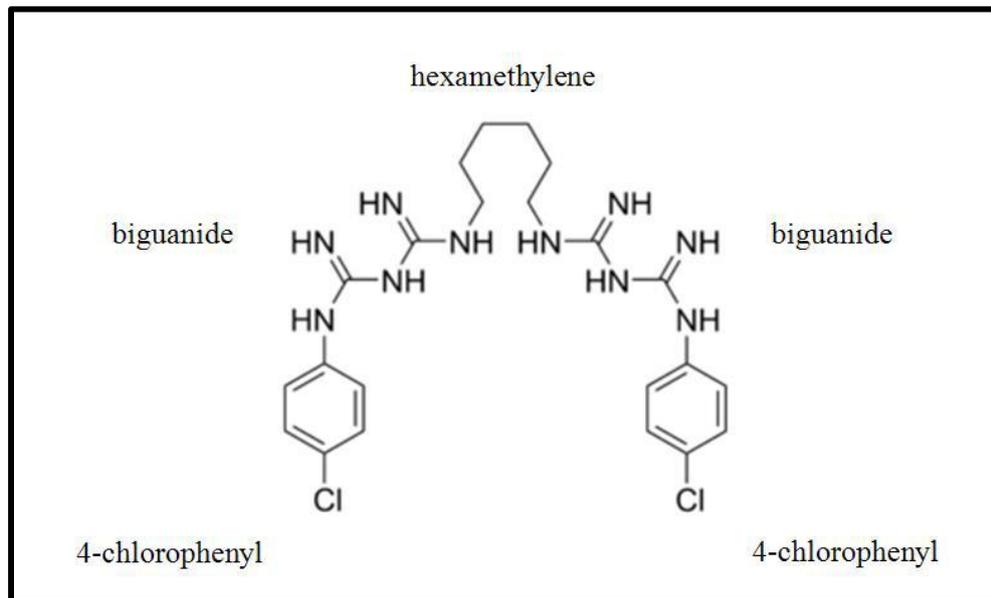


Figura N° 6: Estructura de la clorhexidina⁴⁷

Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a pH superior a 3.5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica que la hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios colaterales y dificultad para formularla en productos. Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua.⁴⁶

Clorhexidina fue desarrollada en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra, por científicos que realizaban estudios sobre la malaria. Los investigadores fueron capaces de desarrollar

compuestos denominados polibiguanidas, que demostraron tener amplio espectro antibacteriano; salió al mercado en 1954 como antiséptico para heridas de la piel, posteriormente se usó en medicina y cirugía. En odontología se utilizó inicialmente como antiséptico bucal y en tratamientos de endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia fue realizado por Løe y Schiott en 1970, demostrando que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con solución de gluconato de clorhexidina al 0,2% en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y consecuentemente, desarrollo de gingivitis.^{45,46,48-50}

2.2.6.2. Propiedades

Clorhexidina es un eficaz antiséptico de amplio espectro frente a microorganismos de la placa bacteriana. Su acción es rápida y mantiene su efecto durante largo período, liberándose en forma gradual por difusión en la cavidad oral hasta por 24 horas, según vaya disminuyendo la concentración de clorhexidina en la saliva, evitando así la posible recolonización bacteriana en cavidad oral. Debido a su carga positiva, se adsorbe, durante el enjuague oral, en la superficie de los dientes, placa y mucosa oral, que tienen una carga neta negativa, formando un sistema de liberación sostenida. La Clorhexidina actúa a distintos niveles: Elimina la estructura de la placa bacteriana existente, inhibe la adhesión de proteínas muco-salivares, inhibe la formación de nueva placa bacteriana y destruye microorganismos responsables de formación de placa dental. En bajas concentraciones es bacteriostática y en las elevadas es bactericida. La baja absorción de clorhexidina es un factor en su baja toxicidad. Se metaboliza en el organismo, absorbiéndose débilmente por la mucosa del tracto digestivo, eliminándose por las heces el 90% del fármaco absorbido y el resto lo hace por orina. No se acumula en el organismo ni se metaboliza en sustancias lesivas.^{45,49}

La clorhexidina se usa, en la mayoría de casos, para tratamiento de enfermedades periodontales; al actuar como agente bacteriostático o

bactericida, actuando sobre bacterias cariogénicas. La clorhexidina es el agente antimicrobiano bucal más usado, efectivo e investigado en eliminar o disminuir el *Streptococcus mutans* en procesos dependientes de este microorganismo.⁵¹

La clorhexidina 0.12% presenta efecto inhibitor significativo en la actividad de las enzimas proteolíticas que generan caries dentinaria.⁵³

Investigaciones realizadas muestran que la inhibición importante del crecimiento de *Streptococcus mutans* y la incapacidad siguiente de crecer como placa bacteriana en presencia de sacarosa ocurría después de un régimen de exposición escalonado a clorhexidina inicialmente y luego a xilitol.¹⁸

Se ha reportado también que los barnices de clorhexidina son capaces de reducir los niveles de *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* y la gingivitis, mejorando la salud oral del paciente.⁵³

2.2.6.3. Mecanismo de acción

Clorhexidina se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce aumento de la permeabilidad con filtración de componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático). En concentraciones altas produce precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida). En boca se adsorbe rápidamente a las superficies de contacto, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. Los depósitos de clorhexidina se forman por la interacción reversible de la molécula de clorhexidina con grupos fosfato, sulfato y carboxilo de los tejidos blandos y duros. La clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8-12 horas en su forma activa. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo. Su pH óptimo se encuentra entre 5.5 y 7.0; en función de éste ejerce su acción frente a diferentes bacterias. Con un pH entre 5.0 y 8.0, es activa frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los estreptococos orales

transportan azúcares a través del sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa. La clorhexidina incluso en baja concentración, inhibe este sistema; esto podría explicar el hecho de que, a bajas concentraciones, clorhexidina puede reducir la producción de ácido a partir de glucosa por estreptococos orales sin afectar su viabilidad celular.⁴⁵⁻⁴⁸

La clorhexidina previene la formación de placa por medio de los siguientes pasos:⁴⁶

- Bloquea grupos de ácidos libres de las glicoproteínas salivales (mucinas), que forman la película adquirida que permitirá la formación de placa bacteriana, siendo ésta su primera capa, no permitiendo la formación de la misma.
- La carga iónica positiva de la clorhexidina atrae a la superficie microbiana de carga negativa, para lo que contribuye el pH del medio, que es neutro o básico, permitiendo a los microorganismos unirse a las moléculas de clorhexidina y no se adhieran a la película adquirida. La clorhexidina actúa sobre la membrana de microorganismos produciendo cambios electroforéticos que actúan sobre las bacterias produciendo precipitación de iones potasio y fosfato. A mayor concentración de clorhexidina se produce una precipitación plasmática de los microorganismos, causándoles la muerte, lo que le confiere efecto bactericida.
- La clorhexidina también destruye la placa formada al competir con el ión calcio, factor coadyuvante de la formación y crecimiento de placa bacteriana que actúa como molécula de enlace que permite a las bacterias fijarse a la película adquirida sin impedimentos. Cuando la clorhexidina se une al ión calcio, impide la unión del mismo a las bacterias.
- A altas concentraciones la clorhexidina produce tras unirse a la pared bacteriana, cambios electroforéticos que causan precipitación citoplasmática que conlleva la muerte celular.

2.2.6.4. Presentaciones

La clorhexidina se puede encontrar en diversas presentaciones, así tenemos: ⁴⁶

- **Colutorios:** es la más utilizada, su forma de presentación común es en solución al 0.12% para enjuagues de 15 ml durante 30 segundos y al 0.2% para enjuagues de 10 ml.
- **Dentífricos:** es difícil formular la clorhexidina en una pasta dental.
- **Geles:** en comparación con el colutorio, el gel muestra mayor control en la inflamación gingival debido a mayor adherencia a la superficie dental y mucosa; su uso no sólo se justificaría en el control de enfermedad periodontal, sino también como antiséptico de acción localizada.
- **Barnices:** El barniz de clorhexidina presenta eficacia probada en la reducción de *Streptococcus mutans*. Además, se reducen los efectos secundarios como alteraciones del gusto y el sabor amargo, así como la ausencia de lesiones mucosas al ceñirse la aplicación a la superficie dentaria disminuyendo el contacto con superficies mucosas.
- **Aerosoles:** Presentación más usada en pacientes con discapacidad física y psíquica, por la comodidad de aplicación por parte de familiares.
- **Irrigaciones:** Con irrigaciones pulsátiles al 0.06% sólo se obtienen resultados transitorios con ventaja de ser agradable para el paciente. La irrigación del surco gingival con agua reduce el número de microorganismos, al adicionar agentes antimicrobianos se consigue disminuir aún más el número de microorganismos.
- **Chicles con clorhexidina:** se ha demostrado su eficacia consiguiendo reducción significativamente mayor de índices de placa y gingivitis que los chicles placebo y similares resultados a 2 enjuagues diarios con clorhexidina. Además los chicles presentan ventaja de producir menor tinción en dientes y superficies orales.

2.2.7. *Streptococcus mutans*

2.2.7.1. Clasificación

Esta especie bacteriana presenta la siguiente clasificación taxonómica:⁵⁴

DOMINIO	: Bacterias
PHYLUM	: <i>Firmicutes</i>
CLASE	: <i>Bacilli</i>
ORDEN	: <i>Lactobacillales</i>
FAMILIA	: <i>Streptococcaceae</i>
GÉNERO	: <i>Streptococcus</i>
ESPECIE	: <i>Streptococcus mutans</i>

2.2.7.2. *Streptococcus mutans* y grupo mutans

La especie *Streptococcus mutans* se ubica dentro de un conjunto de bacterias denominado “Grupo Mutans”, los cuales presentan diversidad genética, antigénica y bioquímica; también, comparten rasgos fenotípicos como fermentación del manitol y sorbitol, producción de glucanos extracelulares a partir de sacarosa, ciertos morfotipos coloniales al ser cultivados en agar con sacarosa y la inducción de caries a partir del consumo de carbohidratos (sobre todo sacarosa) por parte del huésped.⁵⁵

El grupo mutans está conformado por las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. downei*, *S. macacae* y *S. ferus*. La primera diferenciación de las distintas cepas se efectuó a partir de su perfil de producción de bacteriocinas; posteriormente se encontró que existían ocho grupos serológicos en las especies del grupo mutans. Los dos grandes subgrupos presentan respectivamente los serotipos c/e/f (correspondiente a *S. mutans*) y d/g (*S. sobrinus*). Las especies del grupo mutans predominantes en la boca de la mayoría de los sujetos corresponden al *S. mutans*, mientras que el *S. sobrinus* aparece en menos individuos y en cantidades menores.⁵⁶

El *Streptococcus mutans* presenta el serotipo c, que es el más frecuente en la colonización inicial, que se produce en función de características particulares de la saliva de cada individuo.^{57,58}

2.2.7.3. Descripción

S. mutans es un coco Gram positivo, que se dispone en pares o cadenas cortas; es anaerobio o aerobio facultativo, ya que para desarrollarse necesita medios enriquecidos y ambientes de microaerofilia o anaerobiosis, con una tensión de CO₂ al 10%. Posee los polisacáridos antigénicos definidos para los serotipos c, e y f, siendo el serotipo c el más predominante de la cavidad oral en humano.⁵⁹⁻⁶¹

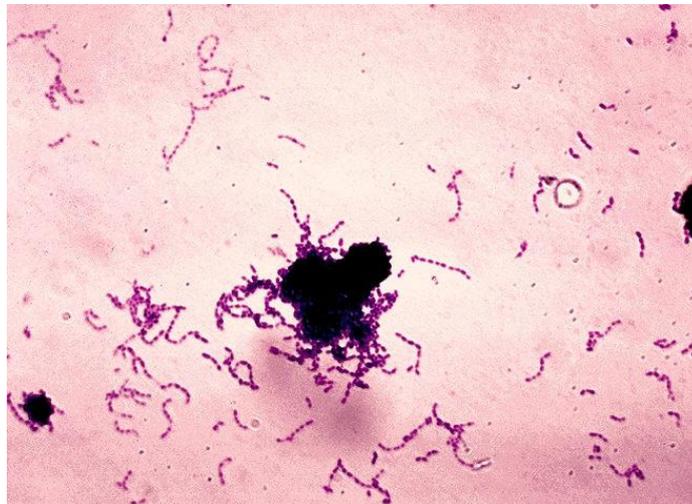


Figura N° 7: Streptococcus mutans.

Fuente: <http://www.microbiologybook.org/fox/newgram4.jpg>

2.2.7.4. Estructura celular

El *Streptococcus mutans* tiene una pared celular gruesa, ésta se compone de peptidoglicano (mureína) y ácidos teicoicos que impiden la lisis osmótica del protoplasto celular y le confieren rigidez y forma. Presenta proteínas fijadoras de glucanos, que intervendrían en la adhesión a la película adquirida, cuando en ella existen glucanos adsorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. Posee proteínas parietales superficiales, que pueden liberarse al medio en el curso de crecimiento bacteriano, y se comportan como adhesinas; son

conocidas como antígenos I/II, y medirían la adhesión a la película adquirida en ausencia de glucanos en su superficie y la coagregación con otras bacterias. El papel que desempeñan sus fimbrias y ácidos lipoteicoicos en los procesos de adhesión a tejidos del hospedador y en los de agregación bacteriana es controvertida. El *S. mutans* se compone de ADN circular y tiene por lo menos tres estrechamente relacionados, pero diferentes plásmidos. Los tamaños de estos plásmidos son similares, de aproximadamente 5,6 kilobases (kb). Estos son importantes para *S. mutans* debido a sus funciones, incluyendo la resistencia a ciertos antibióticos o metales pesados; la producción de bacteriocina y la inmunidad, las vías catabólicas de accesorios y los mecanismos para la conjugación como las actividades de transferencia.^{59,62}

2.2.7.5. Factores de virulencia

Los factores de virulencia son los que promueven la colonización e invasión en tejidos, haciendo que las bacterias alcancen altos niveles de población antes que se vean limitadas por la respuesta del hospedero. En el caso del *S. mutans*, tenemos los siguientes:⁶³

- **Acidogenicidad:** *S. mutans* es capaz de fermentar diversos azúcares, particularmente manitol y sorbitol. En medios ricos en carbohidratos se genera ácido láctico como producto final del metabolismo, el cual se ha asociado con el origen de caries.
- **Aciduricidad:** es la tolerancia al ácido, que le permite mantener una capacidad glicolítica a niveles bajos de pH (pH 4.4), donde el crecimiento de otras especies está inhibido.
- **Acidofilicidad:** *S. mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula.
- **Síntesis de polisacáridos extracelulares:** A partir de la fermentación de hidratos de carbono, principalmente de la sacarosa, el *S. mutans* puede sintetizar polisacáridos extracelulares como glucanos (dextrán y leván) y fructanos, que promueven la adherencia selectiva y acumulación de un amplio

número de estreptococos cariogénicos en los dientes, además de aumentar la porosidad y dimensión de la matriz de la placa dental. Esto permite una mayor difusión de sustrato a través de la superficie del esmalte, se produce un descenso de los valores de pH en capas más profundas de la placa y se favorece el desarrollo de la caries.

- **Síntesis de polisacáridos intracelulares:** como el glucógeno, que puede ser degradado por dextranasas, fructanasas y glucógenofosforilasas. Sirve como reserva alimenticia y mantiene la producción de ácido durante largos periodos aún en ausencia de consumo de azúcar.

2.2.7.6. Hábitat

El principal hospedador del *S. mutans* es la boca del hombre, puede desarrollarse en temperaturas que van desde 18 a 40 °C. Coloniza especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte o cemento); se han obtenido también aislamientos a partir de heces humanas. El *S. mutans* induce lesiones cariosas tanto de superficies lisas, de fosas y fisuras, como en zonas interproximales y cemento radicular. A nivel extraoral, el *S. mutans* está relacionado con endocarditis subagudas y raramente con otros procesos patológicos.⁵⁹

2.3. DEFINICIÓN DE LOS TÉRMINOS BÁSICOS

- **In vitro:** Producido en el laboratorio por métodos experimentales.⁶⁴
- **Extracto:** Producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales.⁶⁴
- **Principios activos:** son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal.⁶⁴
- **Inocular:** Introducir en un organismo una sustancia que contiene los gérmenes de una enfermedad.⁶⁴
- **Bacteriostático:** Que impide la proliferación de bacterias.⁶⁴
- **Bactericida:** Que destruye las bacterias.⁶⁴

- **Concentración:** Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en el sistema internacional es la mol por metro cúbico (mol/m³).⁶⁴
- **Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables.⁶⁴
- **Concentración Bactericida Mínima (CBM):** Es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas.⁶⁴
- **Inhibición:** Disminución o detención de las funciones normales de una parte del organismo por medios mentales o químicos.⁶⁴
- **Aeróbio:** Microorganismo que vive y crece en presencia de oxígeno libre. Los aerobios se dividen en aerobios facultativos y aerobios obligados.⁶⁴
- **Gram positivo:** Que conservan el color violeta de la tinción que se utiliza en el método de Gram. para teñir microorganismos.⁶⁴
- **Actividad antibacteriana:** La actividad antimicrobiana se define como la capacidad de matar, inhibir y/o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.⁶⁵
- **Extracto hidroalcohólico:** Alcohol puro de 96 grados y plantas. Los extractos pueden actuar como insecticidas, fungicidas y repelentes, dependiendo de la planta que uno utiliza para su elaboración. La función del alcohol es de extraer las sustancias, o las propiedades, de las plantas. A este tipo de extracto de alcohol con agua, se le llama una tintura.⁶⁶
- **Cepas:** Conjunto de microorganismos derivados de las múltiples divisiones de una célula inicial.⁶⁷
- **ATCC:** Son siglas del American Type Culture Collection una organización encargada de la adquisición, autenticación, producción, conservación, desarrollo y distribución de los microorganismos de referencia estándar.⁶⁸

CAPÍTULO III:

**HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA
INVESTIGACIÓN**

3.1. FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS PRINCIPAL Y DERIVADAS

3.1.1. Hipótesis principal

Es probable que la obtención y aplicación del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” posean actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

3.1.2. Hipótesis derivada

Es probable que el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” posea actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diferente a la clorhexidina al 0.12%.

3.2. VARIABLES; DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL

Variables		Indicadores	Naturaleza	Escala de medición
Independientes: Sustancias antimicrobianas	Extracto de la <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla”	7.8mg/ml 15.6 mg/ml 31.2 mg/ml 125 mg/ml 250 mg/ml	Cualitativa	Ordinal
	Gluconato de clorhexidina al 0.12 %	0.12%	Cualitativa	Ordinal
Dependientes: Acción antibacteriana <i>in vitro</i> .	Acción antibacteriana	Diámetro del Halo de inhibición	Cuantitativa	Razón

CAPÍTULO IV:

METODOLOGÍA

4.1. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1.1. Tipo de estudio

La investigación es de tipo experimental porque se aplicó el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” sobre cepas de *Streptococcus mutans* para establecer su capacidad antibacteriana.

4.1.2. Diseño de investigación

4.1.2.1. De acuerdo a la temporalidad

Transversal: Porque la información se obtuvo de una única medición a las 48 horas.

4.1.2.2. De acuerdo al lugar de recolección de datos

Laboratorial: El estudio fue in vitro y se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Alas Peruanas Filial - Arequipa.

4.1.2.3. De acuerdo al momento de la recolección

Prospectivo: Ya que se obtuvo información a medida que se iba desarrollando la investigación.

4.1.2.4. De acuerdo a la finalidad investigativa

Relacional - Comparativo: Porque se estudió la influencia de la variable independiente (extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”) sobre una variable dependiente (diámetro del halo de inhibición del *Streptococcus mutans* ATCC 25175), también se comparó con el efecto de la Clorhexidina al 0.12% de acuerdo al diámetro del halo de inhibición del *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

4.2. DISEÑO MUESTRAL

Para la presente investigación se ha trabajado con 21 placas de Petri; cada placa de Petri fue dividida para las concentraciones de la “Jarilla”, la clorhexidina al 0.12% y la glicerina.

4.2.1. Criterios de inclusión

- Cepa liofilizada de "*Streptococcus mutans*" ATCC 25175.
- Extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla".
- Gluconato de clorhexidina al 0.12%.

4.2.2. Criterios de exclusión.

- Medios de cultivos contaminadas con otros microorganismos.
- Antibiograma en Agar Mitis Salivarius.

4.3. TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica que se empleó en la presente investigación fue la observación laboratorial, y el instrumento que se utilizó para la recolección de los datos fue una ficha de recolección de datos. **(Véase ANEXO N° 1)**

4.3.1. Procesamiento del material vegetal

4.3.1.1. Obtención de la planta

La planta *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" fue recolectada el 21 de agosto del 2017 en horas de la tarde en las laderas de Central – Aplao, Región Arequipa. La identificación taxonómica de la planta fue realizada por el herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA), Arequipa-Perú. **(véase ANEXO N° 2)**

4.3.1.2. Estabilización

La planta recolectada fue lavada para eliminar residuos (polvo), luego las hojas fueron seleccionadas y dispuestas en bandejas de papel aluminio para ser sometidas a calor seco a temperatura de 80 °C en una estufa por un periodo de 15 minutos y así evitar la acción enzimática.⁴³

4.3.1.3. Molienda y empaquetamiento

Se procedió a la pulverización con la ayuda de un mortero y pistilo hasta la obtención de partículas uniformes luego se procedió a pesar 10 g de

hojas pulverizadas de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla", y se empaquetó en papel filtro.⁴³ **(Véase ANEXO N° 3)**

4.3.2. Método de obtención del extracto

4.3.2.1. Extracción por Soxhlet

El empaquetado de los 10 g fue colocado en el sifón del equipo extractor; seguidamente en el balón del equipo extractor se colocó 250 ml del solvente indicado (etanol 96°) procediéndose a armar el equipo. Se colocó el balón a baño maría a una temperatura de 78 °C por un periodo de 16 horas, hasta que el solvente haya agotado toda la muestra del cartucho (12 ciclos), finalmente se procedió a desarmar el equipo enfriándolo previamente y así obteniéndose el extracto etanólico. Este procedimiento se realizó 3 veces. **(Véase ANEXO N° 4)**

4.3.2.2. Determinación del Rendimiento de la Extracción

El porcentaje de rendimiento de extracción (%RE) o el porcentaje de sólidos solubles, se fundamenta en determinar la diferencia de peso al evaporar el solvente del extracto obtenido.⁴⁴ **(Véase ANEXO N° 5)**

4.3.2.3. Procedimiento

Se llevó los extractos al equipo de destilación obteniéndose un extracto casi seco, estos extractos se colocaron en vasos de precipitado previamente rotulados y se llevó a baño maría hasta sequedad total, para finalmente ser pesados para determinar su porcentaje de rendimiento por diferencia de peso. El porcentaje de rendimiento se determina mediante la siguiente ecuación:⁴⁴

$$\%RE = \frac{\text{Peso de Extracto seco} \times 100}{\text{Peso de las hojas secas}}$$

4.3.3. Preparación del material microbiológico

4.3.3.1. Obtención del *Streptococcus mutans*

La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se obtuvo del laboratorio GenLab del Perú S.A.C. Tecnología para la vida (**Véase ANEXO N° 6**), también proporcionaron el protocolo de bioseguridad para la manipulación de las cepas (**Véase ANEXO N° 7**) y se realizó las evaluaciones con el extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla".

4.3.3.2. Activación de las cepas bacterianas

La cepa estándar ATTC (American Type Culture Collection) 25175 *Streptococcus mutans* liofilizada se mantuvo en condiciones de refrigeración (2-8 °C); se reactivó utilizando un tubo de ensayo mediano con medio de cultivo de caldo BHI (Brain Heart Infusion), en la cual se procedió a sembrar la cepa y se incubó a 37°C por 24 horas; para su reproducción, se repicó (en una placa de Petri) en agar Mitis Salivarius y también se llevó a la incubadora por 24 horas, a partir de las colonias desarrolladas en este medio se realizó la coloración de Gram para constatar su pureza y se extrajo 4 a 5 colonias para la escala de McFarland. (**Véase ANEXO N° 8**)

4.3.3.3. Coloración Gram

- Se colocó una azada de bacterias sobre una lámina portaobjetos limpia.
- Se dejó secar a temperatura ambiente, con la finalidad de que el material no sea arrastrado durante el proceso de tinción.
- Se colocó la lámina sobre un soporte de tinción y fue cubierta con solución de cristal violeta por 1 min. Luego se procedió a lavar la lámina con agua de caño.
- Se cubrió la lámina con lugol durante 1 min. Y se procedió a lavar.
- Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañó la superficie con el colorante Acetona-Alcohol hasta no arrastrar más colorante violeta (10 segundos).

- Se cubrió la superficie de la lámina con Safranina por 1 min. y se lavó.
- Se observó al microscopio a 40 x y posteriormente a 100x con aceite de inmersión, evidenciándose colonias Gram-positivos agrupadas en cadenas y pares lo que nos indica que son colonias de *Streptococcus mutans*. **(Véase ANEXO N° 9)**

4.3.4. Evaluación de la actividad antibacteriana

4.3.4.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

A. Método de la dilución en caldo

Esta prueba se basó en la sensibilidad del microorganismo, se realizó diluciones seriadas del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” en caldo BHI, después se agregó la suspensión bacteriana estandarizada de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 para determinar la concentración del extracto que inhibe el crecimiento bacteriano.⁷⁰ **(Véase ANEXO N° 10)**

B. Preparación del extracto madre

Se preparó una solución madre con 2.5 g de *Larrea divaricata* Cav “Jarilla” en 10 ml de glicerina, lo que nos da una concentración madre de 250 mg/ml.⁷¹

C. Preparación del inóculo

El inóculo debe contener una concentración de 10^8 UFC/ml; para ello se utilizó un asa de Kolle estéril se tocó las superficies de 4 a 5 colonias que han sido aisladas en agar Mitis Salivarius. Se sumergió con el asa de Kolle en 10 ml de caldo BHI descargando todo el material bacteriano y luego se retiró el asa. La turbidez del medio fue semejante a la del tubo N° 0.5 de la escala de McFarland, la cual equivale, a una concentración de 10^8 UFC/ml.⁷¹

Se colocó en la estufa a 37°C por 24 horas.

D. Preparación de las diluciones

Para la dilución se necesitó una concentración de 10^6 UFC/ml, para ello se procedió a realizar una dilución de 1:100 del inóculo ya preparado (10^8 UFC/ml). Es decir, se puso en un tubo de ensayo 9.9 ml de caldo BHI y después se agregó 0.1 ml de la concentración de 10^8 UFC/ml.⁷¹

- Se colocó a cada tubo 1 ml de caldo BHI (12 tubos).
- Al tubo N°1 se añadió 1 ml del extracto, se mezcló y retiró 1ml; y este ml se añadió al tubo N°2.
- Del tubo N°2 se retiró 1 ml y se añadió al tubo N°3 y se mezcló.
- Del tubo N°3 se retiró 1 ml y se añadió al tubo N°4 y se mezcló y así sucesivamente hasta el tubo N°10.
- El tubo N°11 solo contiene caldo BHI (Control Negativo).
- El tubo N°12 solo contiene caldo BHI y suspensión bacteriana (Control Positivo).
- Se añadió a cada tubo 1 ml del inóculo de concentración 10^6 UFC/ml.
- Se Incubó los tubos por 24 horas a 37°C.
- Se Observó la turbidez de los tubos para hallar el punto de ruptura.
- Los tubos de la izquierda son claros (indica que el desarrollo bacteriano ha sido inhibido por la concentración del extracto); los tubos de la derecha son turbios (indica que el desarrollo bacteriano no ha sido inhibido por la concentración del extracto).

4.3.4.2. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

A. Método de dilución en placa

Este método determinó que, a la menor concentración de la sustancia en investigación, produce la muerte de más del 99.9% de las bacterias en estudio. **(Véase ANEXO N° 11)**

a) Procedimiento

- Se procedió a sembrar en placas con agar nutritivo todos aquellos tubos en los cuales no se observa turbidez.
- Se incubó a 37°C por 24 horas.
- Se observó el crecimiento bacteriano en las placas, luego se procedió a indicar el punto de ruptura.

4.3.4.3. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

A. Método de difusión en discos (Kirby – Bauer)

El principio básico de este método consiste en que el disco impregnado con el antibiótico entra en contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel de filtro y el antimicrobiano se difunde hacia el medio circundante. Para ello antes de que se procediera a ejecutar la sensibilidad antimicrobiana, se realizó una prueba piloto. **(Véase N° ANEXO 12)** Una vez halladas los resultados con la prueba piloto, se ejecutó el propósito de esta investigación.⁷¹ **(Véase ANEXO N° 13)**

a) Preparación de los discos

Se elaboraron discos de papel filtro Whatman de aproximadamente 6 mm de diámetro, con un perforador, los cuales fueron esterilizados en la autoclave por 15 minutos a 121°C, posteriormente fueron almacenados en una placa de Petri previamente esterilizado.⁷¹

b) Inoculación de los discos

Una vez esterilizados y con la ayuda de una placa de Petri estéril, los discos fueron impregnados con las diferentes concentraciones del extracto *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”, la clorhexidina al 0.12% (control positivo) y la glicerina (control negativo).

c) Preparación para determinar la sensibilidad antibacteriana

Se preparó 21 placas de Petri con contenido de agar Müller-Hinton, el cual se sometió a un control de esterilidad por incubación a 37°C por 24 horas. Luego fueron sembradas con el inóculo preparado de la suspensión de la bacteria en estudio equivalente a 10^8 UFC/ml con la ayuda de un hisopo estéril en forma horizontal de derecha a izquierda, en forma vertical de arriba hacia abajo, en el sentido de las agujas del reloj y en contra del sentido de las agujas del reloj, teniendo la precaución de no dejar algún espacio sin suspensión y luego se dejó secar la siembra por 5 minutos.

En cada placa de Petri se colocó cinco discos impregnados con las diferentes concentraciones de los extractos de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" (7.8 mg/ml, 15.6 mg/ml, 31.2 mg/ml, 125 mg/ml y 250 mg/ml), un disco con clorhexidina al 0.12% (control positivo) y un disco con glicerina (control negativo) con la ayuda de una pinza estéril (en total se colocaron 7 discos en cada placa de Petri), se llevó a incubación a 37°C por 48 horas.

Se efectuó la lectura del diámetro de los halos de inhibición alrededor del disco que contiene los extractos y la clorhexidina, la lectura se realizó desde el exterior de la tapa y se anotó en la ficha de recolección de datos, para ello se empleó una regla milimetrada Vernier. **(Véase ANEXO N° 14)**

4.4. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Para el procesamiento de los datos estadísticos se utilizó el software estadístico SPSS Versión 19.0 del cual se usó ANOVA con un nivel de significancia del 5% (0.005).

4.5. ASPECTOS ÉTICOS

Para la presente investigación no se consideran los aspectos éticos puesto que es un trabajo *in vitro*.

CAPÍTULO V:
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

TABLA N° 1

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” sobre cepas de *S. mutans*

	N° de tubos										control		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	+	-	
Caldo BHI	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Extracto de <i>Larrea divaricata</i> Cav. “Jarilla”.	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	/	/
Inóculo 10⁶ UFC/ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	/
Concentración del extracto en mg/ml	125	62.5	31.3	15.6	7.8	3.9	1.95	0.98	0.49	0.24	/	/	
Turbidez <i>S. mutans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
CIM								0.98					

Interpretación:

Para la determinación de la CIM se empleó el método de dilución en caldo BHI (Infusión cerebro-corazón). En la tabla N° 1 se observa que el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” frente a *Streptococcus mutans* tiene una CIM de 0.98 mg/ml la cual representa actividad antibacteriana a menor concentración.

TABLA N° 2

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” sobre cepas de *S. mutans*

Tubo/Placa	5	6	7	8
<i>Streptococcus mutans</i>	NC	NC	C	C
CBM		3.9 mg/ml		

NC: No creció

C: Creció

Interpretación:

Para la determinación de la CBM se empleó el método de dilución en placa.

En la tabla N° 2 se observa que la CBM del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” es de 3.9 mg/ml indicando que a esa concentración produce la muerte del *Streptococcus mutans* en más del 99.9%.

TABLA N° 3

Actividad antibacteriana *in vitro* de la clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans*

CLORHEXIDINA (0.12%)	HALO (mm)
Media Aritmética	12.39
Desviación Estándar	1.13
Halo Mínimo	10.5
Halo Máximo	14.0
Total	21

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En la tabla N° 3 se muestra la actividad antibacteriana de la clorhexidina a una concentración de 0.12%, sobre las cepas de *Streptococcus mutans*.

Como se puede observar de los resultados obtenidos, el halo inhibitorio formado fue en promedio de 12.39 mm, además este osciló entre un valor mínimo de 10.5 y llegó hasta un valor máximo de 14.0 mm.

GRÁFICO N° 1

Actividad antibacteriana *in vitro* de la clorhexidina al 0.12% en cepas de *Streptococcus mutans*

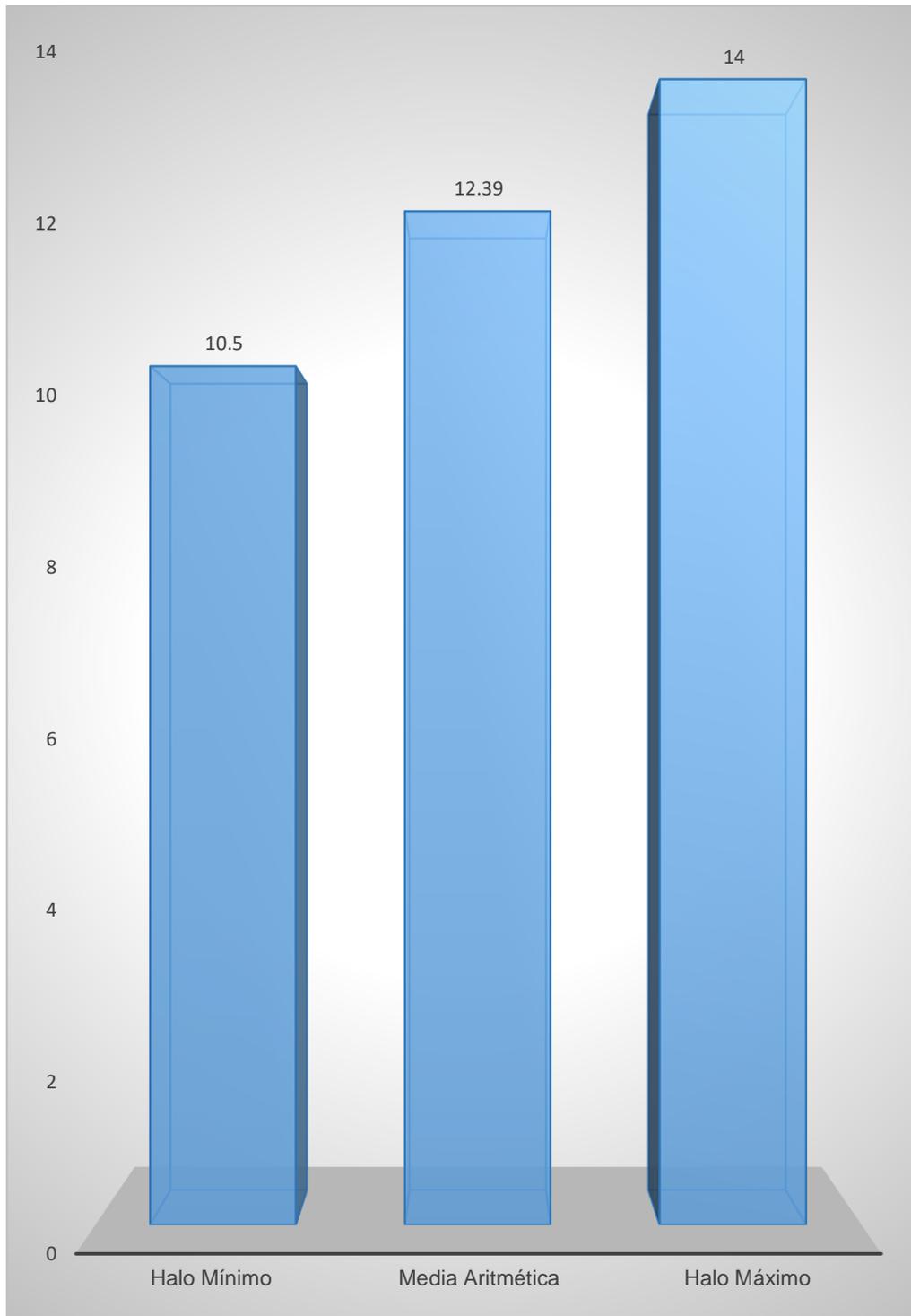


TABLA N° 4

Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” en cepas de *Streptococcus mutans*

GRUPO DE ESTUDIO	HALO DE INHIBICIÓN			
	Media Aritmética	Desviación Estándar	Halo Mínimo	Halo Máximo
Jarilla 7.8 mg/ml	8.44	1.22	6.9	10.5
Jarilla 15.6 mg/ml	11.08	1.52	8.5	13.6
Jarilla 31.2 mg/ml	12.88	1.50	11.0	15.8
Jarilla 125 mg/ml	16.35	0.90	15.0	18.5
Jarilla 250 mg/ml	18.26	0.75	17.2	20.4

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En la Tabla N° 4 se muestra la actividad antibacteriana del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”, en las diferentes concentraciones probadas sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Los resultados obtenidos nos permiten definir que, para una concentración de 7.8 mg/ml, el halo inhibitorio fue en promedio de 8.44 mm; respecto a la concentración de 15.6 mg/ml, el halo correspondió a 11.08 mm; la concentración de 31.2 mg/ml, tuvo un halo de 12.88 mm; en relación a la concentración de 125 mg/ml, el halo que se formó fue 16.35 mm y, finalmente, para la concentración de 250 mg/ml, el halo que se evidenció fue de 18.26 mm. Entonces, de acuerdo a estos valores, las mayores concentraciones de extracto de la “Jarilla” tuvieron los halos de inhibición más grandes.

GRÁFICO N° 2

Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” en cepas de *Streptococcus mutans*

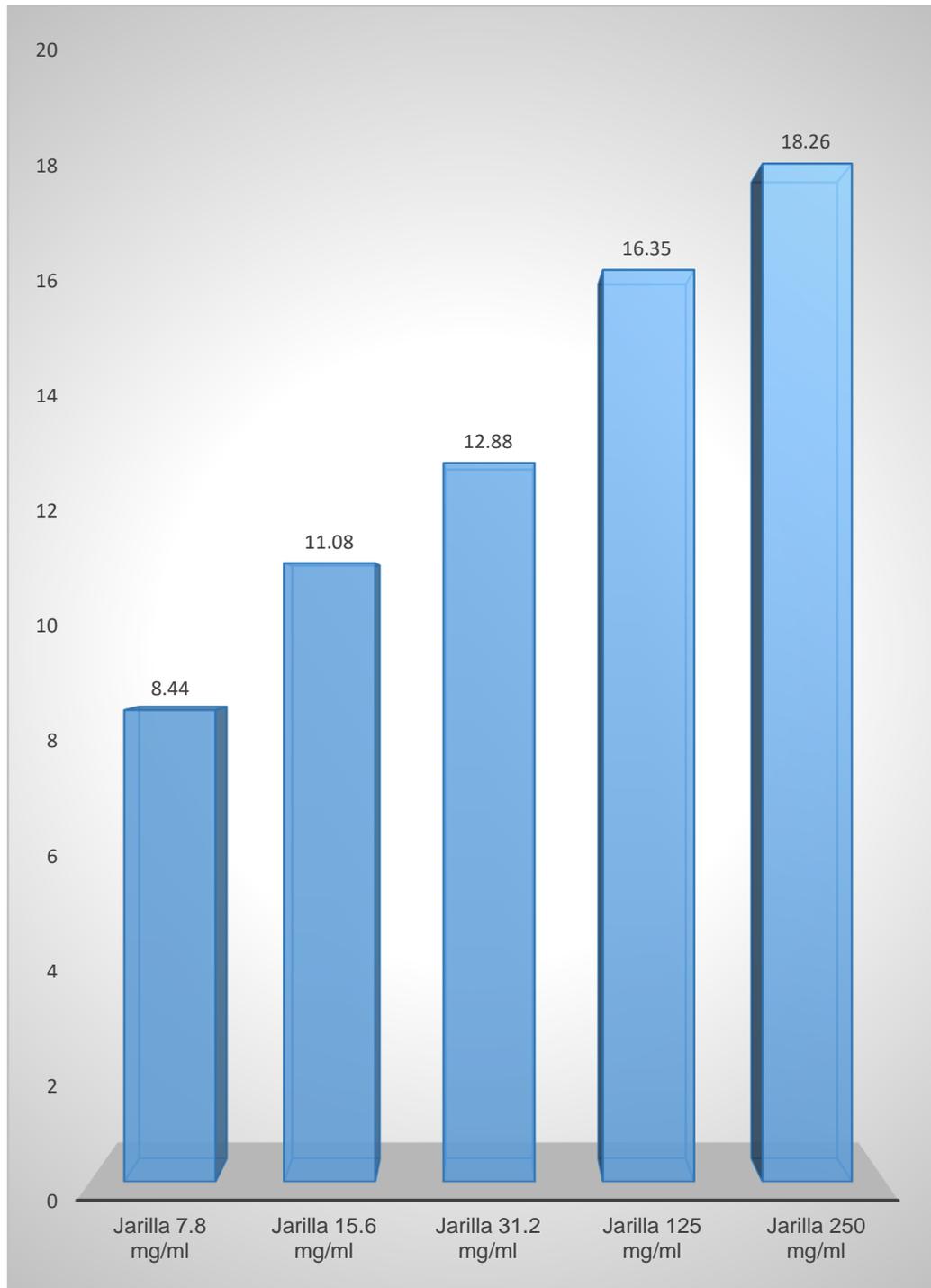


TABLA N° 5

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” de 7.8 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

HALO INHIBICIÓN	GRUPO ESTUDIO	
	Clorhexidina (0.12%)	Jarilla (7.8 mg/ml)
Media Aritmética	12.39	8.44
Desviación Estándar	1.13	1.22
Halo Mínimo	10.5	6.9
Halo Máximo	14.0	10.5
Total	21	21

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En la tabla N° 5 se compara la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con el de “Jarilla” en una concentración al 7.8 mg/ml sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto a la clorhexidina, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 12.39 mm, mientras que, para el extracto de la “Jarilla”, su halo formado correspondió a 8.44 mm; es decir, el halo de inhibición de la clorhexidina fue mayor que el formado por el extracto de la “Jarilla” en esta concentración.

GRÁFICO N° 3

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” de 7.8 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

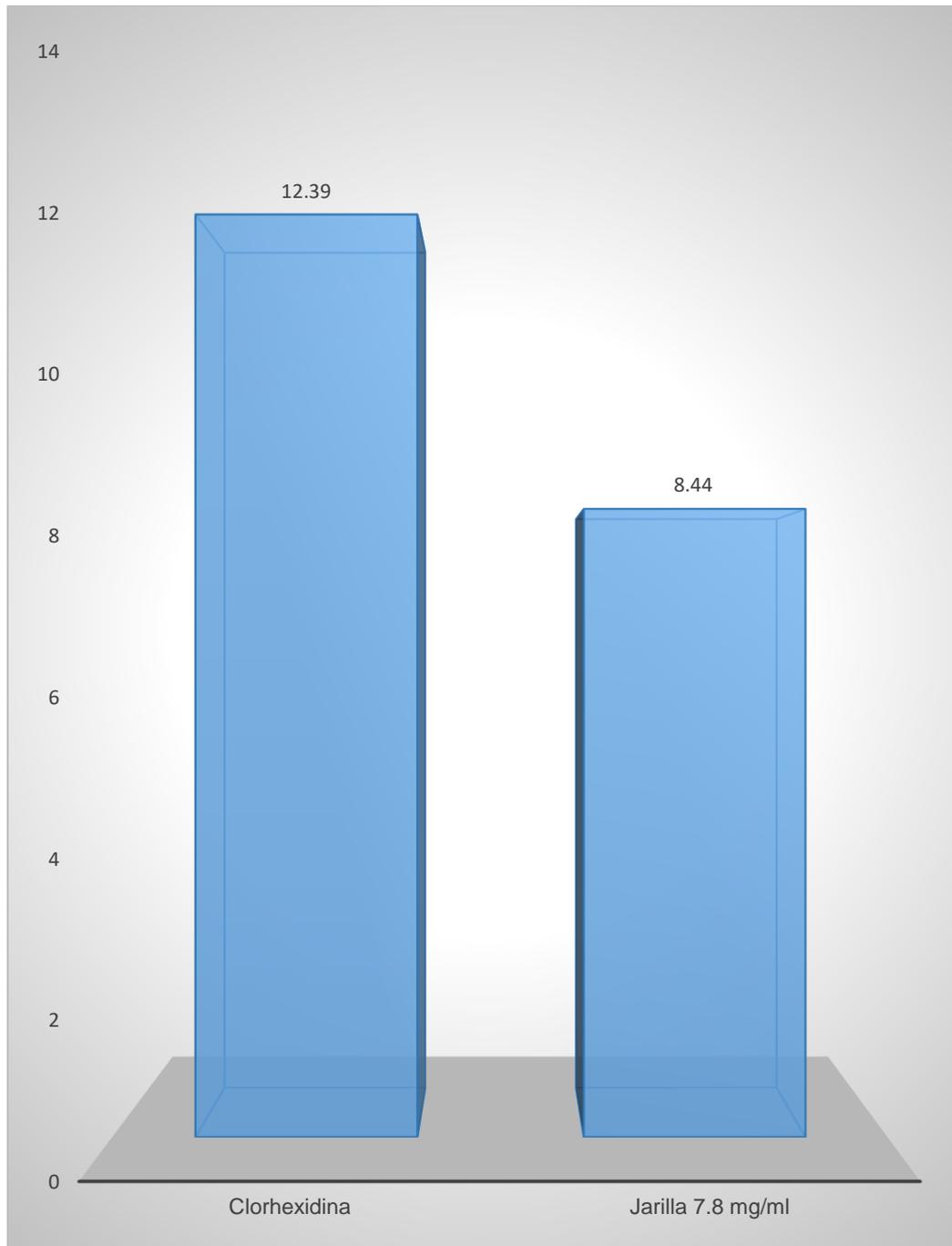


TABLA N° 6

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” de 15.6 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

HALO INHIBICIÓN	GRUPO ESTUDIO	
	Clorhexidina (0.12%)	Jarilla (15.6 mg/ml)
Media Aritmética	12.39	11.08
Desviación Estándar	1.130	1.52
Halo Mínimo	10.5	8.5
Halo Máximo	14.0	13.6
Total	21	21

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En tabla N° 6 se compara la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con el extracto etanólico de la “Jarilla” en una concentración al 15.6 mg/ml sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto a la clorhexidina, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 12.39 mm, mientras que, para el extracto de “Jarilla”, su halo formado correspondió a 11.08 mm; el halo de inhibición de la clorhexidina fue ligeramente mayor que el formado por el extracto etanólico de la “Jarilla” a esta concentración.

GRÁFICO N° 4

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" de 15.6 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

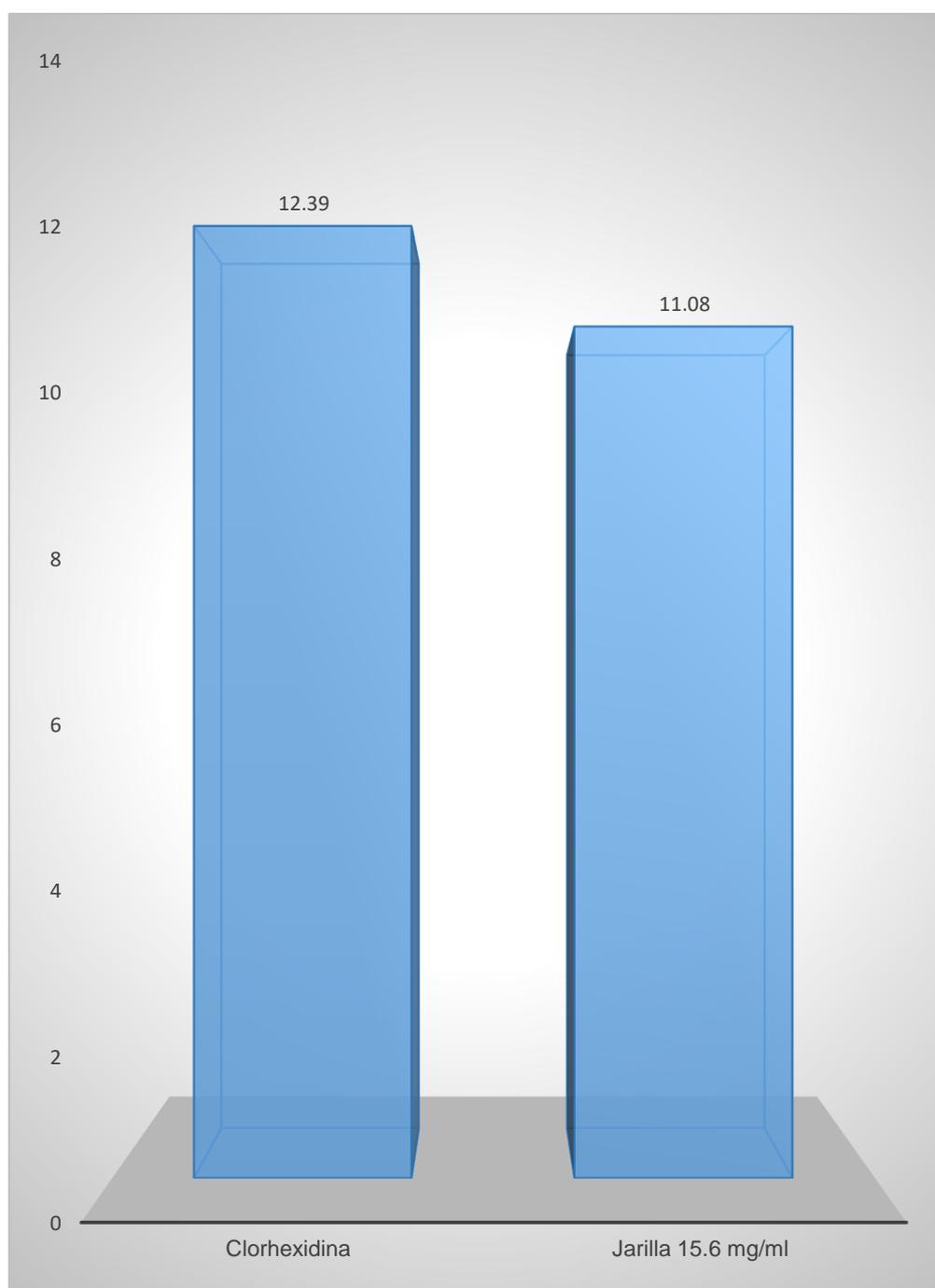


TABLA N° 7

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” de 31.2 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

HALO INHIBICIÓN	GRUPO ESTUDIO	
	Clorhexidina (0.12%)	Jarilla (31.2 mg/ml)
Media Aritmética	12.39	12.88
Desviación Estándar	1.13	1.50
Halo Mínimo	10.5	11.0
Halo Máximo	14.0	15.8
Total	21	21

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En la tabla N° 7 se compara la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con el extracto de “Jarilla” en una concentración al 31.2 mg/ml sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto a la clorhexidina, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 12.39 mm, mientras que, para el extracto de la “Jarilla”, su halo formado correspondió a 12.88 mm; entonces el halo de inhibición de la clorhexidina fue ligeramente menor que el formado por el extracto de la “Jarilla” en esta concentración.

GRÁFICO N° 5

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" de 31.2 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

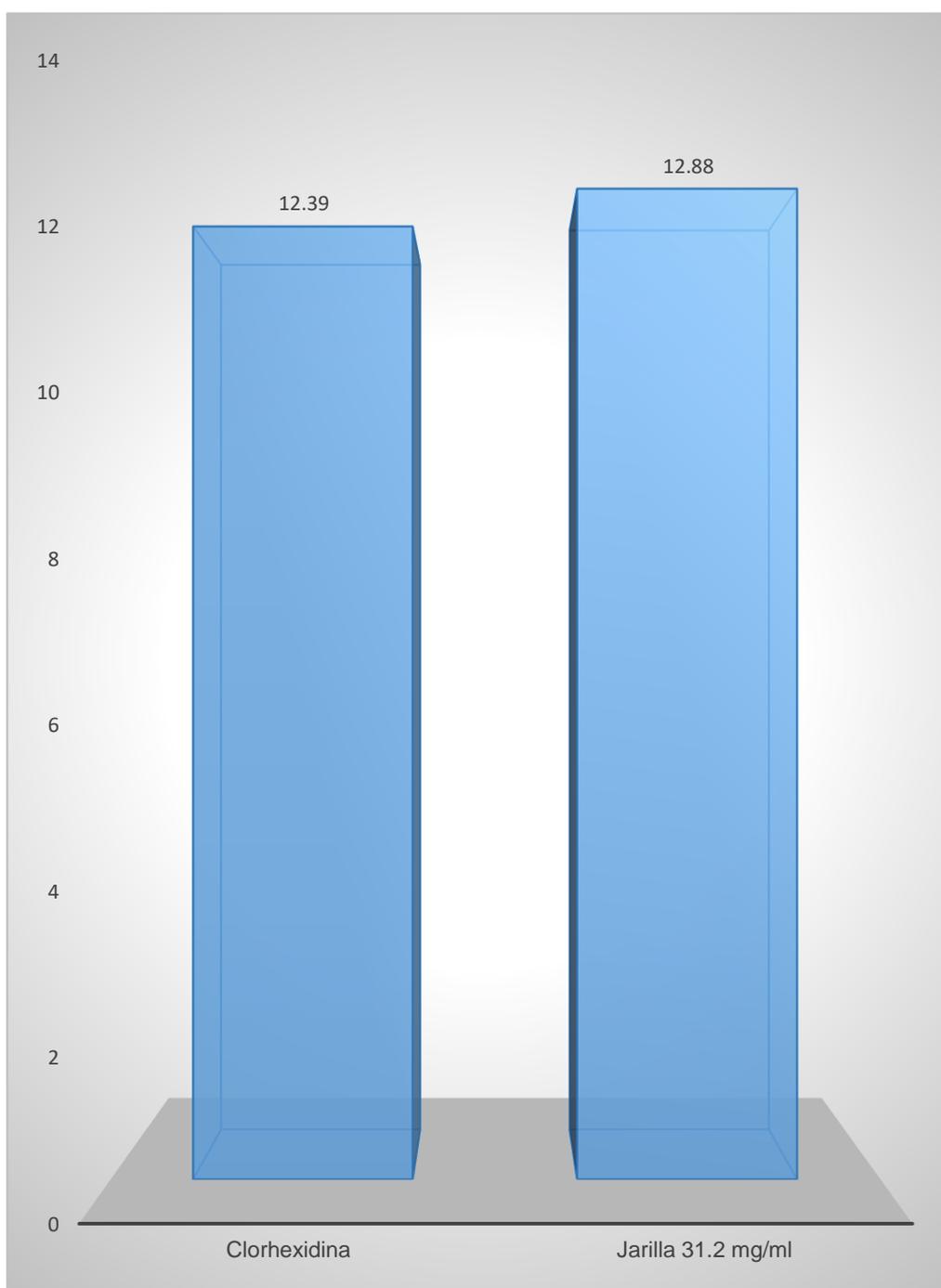


TABLA N° 8

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” de 125 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

HALO INHIBICIÓN	GRUPO ESTUDIO	
	Clorhexidina (0.12%)	Jarilla (125 mg/ml)
Media Aritmética	12.39	16.35
Desviación Estándar	1.13	0.90
Halo Mínimo	10.5	15.0
Halo Máximo	14.0	18.5
Total	21	21

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En la tabla N° 8 se compara la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con el extracto de la “Jarilla” en una concentración al 125 mg/ml sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto a la clorhexidina, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 12.39 mm, mientras que, para el extracto de la “Jarilla”, su halo formado correspondió a 16.35 mm; entonces el halo de inhibición de la clorhexidina fue mucho menor que el formado por el extracto de la “Jarilla” en esta concentración.

GRÁFICO N° 6

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" de 125 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

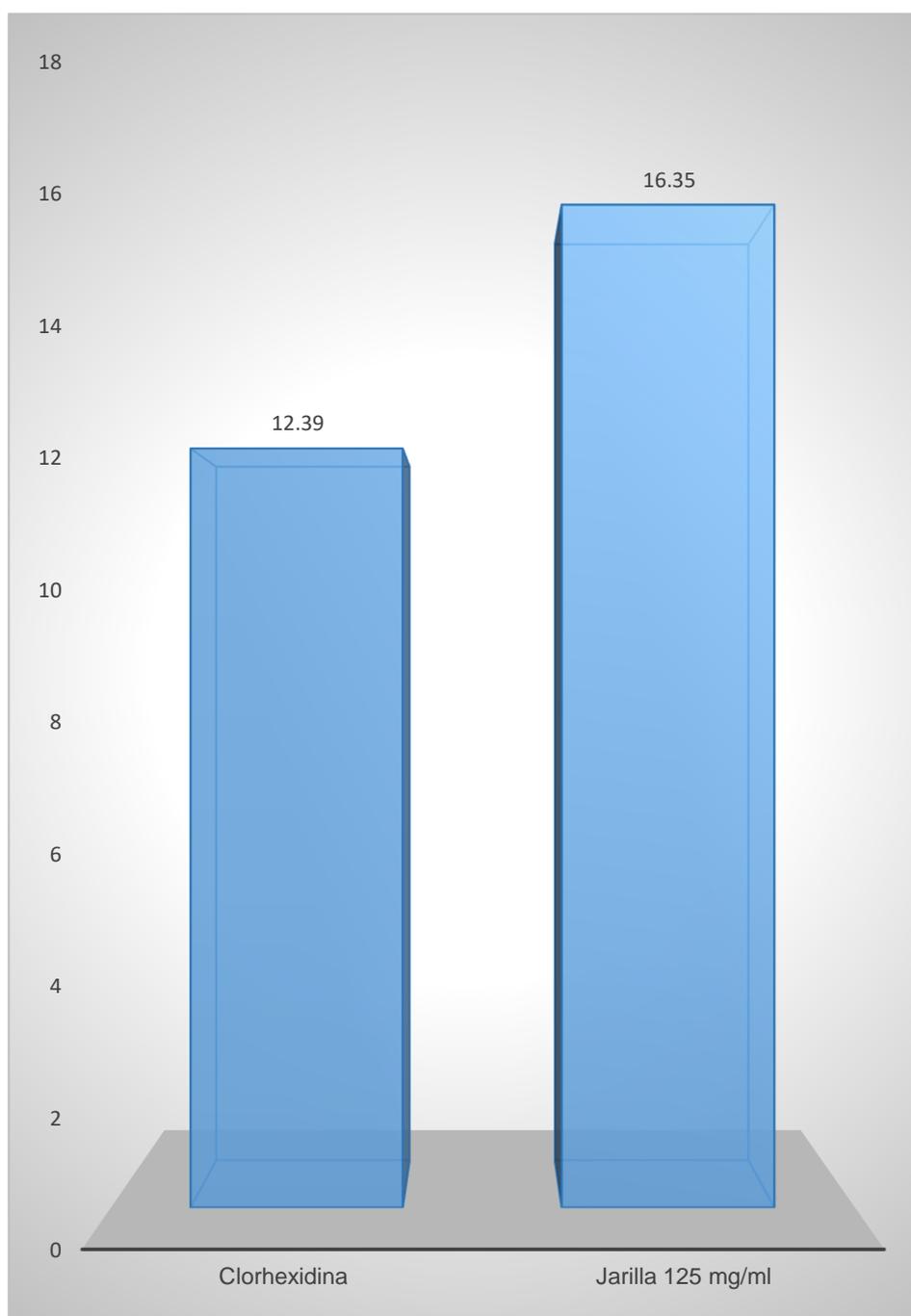


TABLA N° 9

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” de 250 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*

HALO INHIBICIÓN	GRUPO ESTUDIO	
	Clorhexidina (0.12%)	Jarilla (250 mg/ml)
Media Aritmética	12.39	18.26
Desviación Estándar	1.13	0.75
Halo Mínimo	10.5	17.2
Halo Máximo	14.0	20.4
Total	21	21

Fuente: Matriz de datos

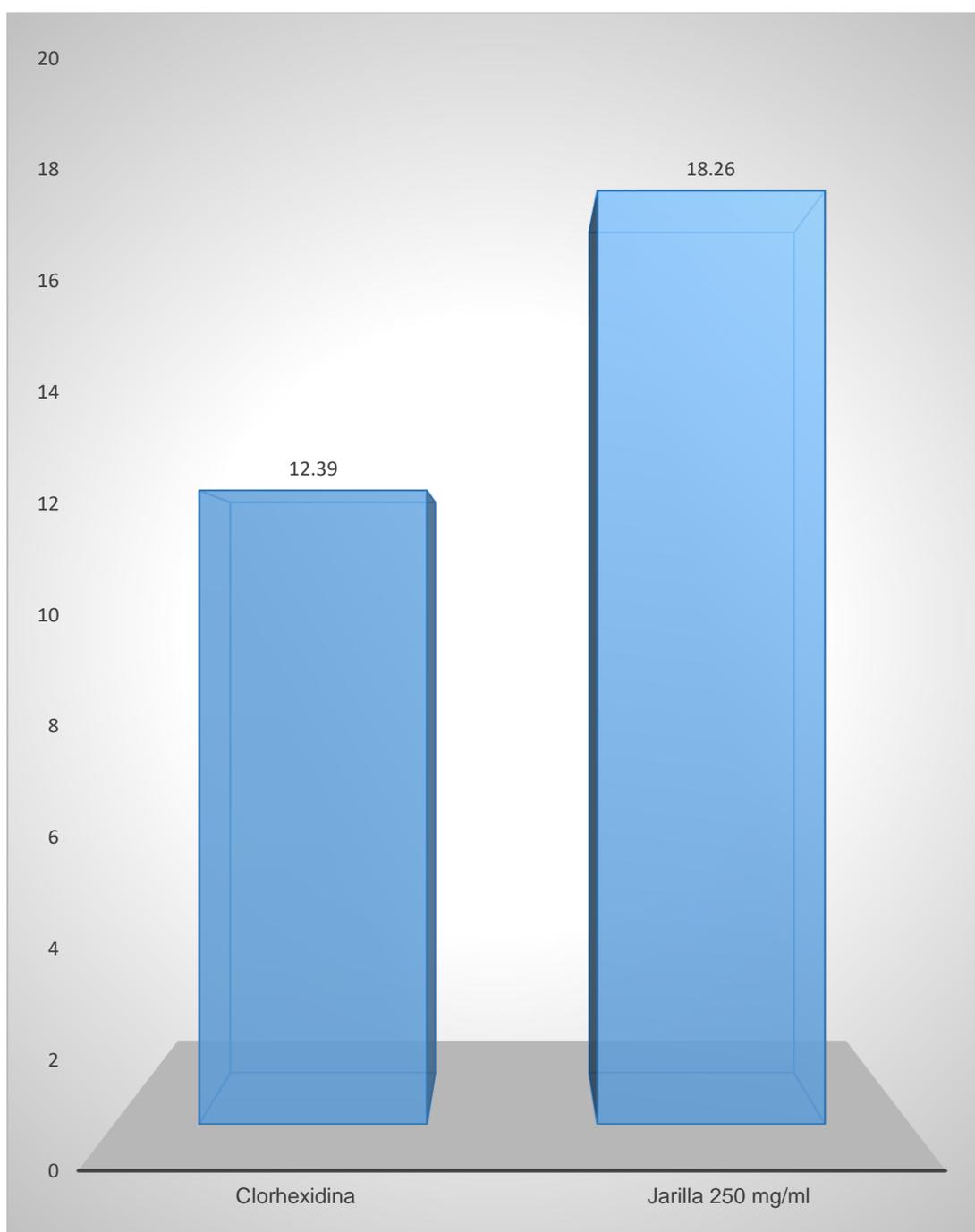
Interpretación:

En la tabla N° 9 se compara la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con el extracto de la “Jarilla” en una concentración al 250 mg/ml sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto a la clorhexidina, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 12.39 mm, mientras que, para el extracto de la “Jarilla”, su halo formado correspondió a 18.26 mm; entonces el halo de inhibición de la clorhexidina fue mucho menor que el formado por el extracto de la “Jarilla” en esta concentración.

GRÁFICO N° 7

Actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" de 250 mg/ml y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans*



5.2. ANÁLISIS INFERENCIAL

TABLA N° 10

Prueba de análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana *in vitro* de las concentraciones del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” sobre el *Streptococcus mutans*

HALO DE INHIBICIÓN	Valor Estadístico	Grados de Libertad	Significancia P
Jarilla 7.8 mg/ml	220.024	100	0.000 (P < 0.05)
Jarilla 15.6 mg/ml			
Jarilla 31.2 mg/ml			
Jarilla 125 mg/ml			
Jarilla 250 mg/ml			

En la comparación llevada a cabo de la actividad antibacteriana sobre las cepas de *Streptococcus mutans* de las diferentes concentraciones del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” (Tabla N° 4), se aplicó la prueba estadística de Análisis de Varianza, que compara más de dos medias aritméticas y nos permite establecer si las diferencias entre los grupos de estudio son o no significativas.

Como se aprecia, según la prueba estadística aplicada, las diferencias encontradas fueron significativas, por tanto, podemos colegir que a mayor concentración del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”, es mayor la actividad antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

TABLA N° 11

Prueba t de Student para comparar la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con las concentraciones del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” sobre el *Streptococcus mutans*

CLORHEXIDINA (0.12%)	Valor Estadístico	Grados de Libertad	Significancia P
Jarilla 7.8 mg/ml	118.123	41	0.000 (P < 0.05)
Jarilla 15.6 mg/ml	9.922	41	0.003 (P < 0.05)
Jarilla 31.2 mg/ml	1.431	41	0.239 (P ≥ 0.05)
Jarilla 125 mg/ml	157.077	41	0.000 (P < 0.05)
Jarilla 250 mg/ml	391.062	41	0.000 (P < 0.05)

En la comparación llevada a cabo de la actividad antibacteriana entre la clorhexidina al 0.12% con las diferentes concentraciones del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” (Tablas N° 5, 6, 7, 8 y 9), se aplicó la prueba estadística t de Student, que compara dos medias aritméticas y nos permite determinar si la diferencia encontrada es, o por el contrario no, significativa.

Como se aprecia, según la prueba estadística aplicada, la diferencia encontrada entre la clorhexidina al 0.12% y la “Jarilla” al 7.8 mg/ml y 15.6 mg/ml fueron significativas, por tanto, a estas concentraciones la clorhexidina tuvo una mejor actividad antibacteriana que la “Jarilla”.

Comparando la clorhexidina al 0.12% con la concentración de “Jarilla” al 31.2%, la diferencia encontrada no fue significativa, es decir, ambos fueron igual de eficaces respecto a su actividad antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto a la clorhexidina al 0.12% frente a la “Jarilla” en sus concentraciones de 125 mg/ml y 250 mg/ml, las diferencias encontradas fueron significativas, por lo que podemos concluir en este caso que la “Jarilla” tuvo mejor efecto antibacteriano que la Clorhexidina.

5.3. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

5.3.1. Hipótesis principal

Es probable que la obtención y aplicación del extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarrilla” posean actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Conclusión

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla N° 10), procedemos a aceptar la hipótesis principal, puesto se ha demostrado que el extracto de *Larrea divaricata* Cav. tuvo actividad antibacteriana, siendo mejor a concentraciones mayores.

5.3.2. Hipótesis derivada

Es probable que el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarrilla” posea actividad antibacteriana *in vitro* frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 diferente a la clorhexidina al 0.12%.

Regla de decisión

Si $P \geq 0.05$ No se acepta la hipótesis.

Si $P < 0.05$ Se acepta la hipótesis.

Conclusión

Tomando en cuenta los resultados obtenidos (Tabla N° 11), procedemos a aceptar la hipótesis derivada, pues queda demostrado que la “Jarilla” a concentraciones de 7.8 y 15.6 mg/ml fue menos efectiva que la clorhexidina, sin embargo, a concentraciones de 125 mg/ml y 250 mg/ml, el extracto fue mejor.

5.4. DISCUSIÓN

En la presente investigación de tipo experimental se buscó comparar la actividad antibacteriana *in vitro* entre el extracto de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” y la Clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175; para ello se realizó concentraciones de 7.8 mg/ml, 15.6 mg/ml, 31.2 mg/ml, 125 mg/ml y 250 mg/ml del extracto de las hojas de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla”; se utilizó la clorhexidina a una concentración de 0.12% que nos sirvió como control positivo y también se usó la glicerina como control negativo, sobre *Streptococcus mutans* “ATCC 25175”.

Aún no se refieren estudios sobre la actividad antibacteriana de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” frente a los *Streptococcus mutans*, pero sí de estudios fármaco-químicos donde se demuestra que esta especie vegetal presenta denominados compuestos fenólicos que le da las propiedades antibacterianas frente a: *H. pylori*, *E. Coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *S. cereviceae*, *C. albicans*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus sciuri*, *B. cinérea*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*; este trabajo de investigación también ha demostrado que el extracto etanólico de las hojas de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” a las concentraciones ya mencionadas, presenta propiedades antibacterianas ya que generó halos de inhibición frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (Gram +) y a las concentraciones de 125 mg/ml y de 250 mg/ml fue mayor al de los halos de inhibición que generó la clorhexidina al 0.12%.

CONCLUSIONES

PRIMERO:

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) *in vitro* del extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue de 0.97 mg/ml. y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) *in vitro* del extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue de 3.90 mg/ml.

SEGUNDO:

La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" a las concentraciones de 7.8 mg/ml produjo una media de 8.44 mm, 15.6 mg/ml produjo una media de 11.8 mm, 31.2 mg/ml produjo una media de 12.88 mm, 125 mg/ml produjo una media de 16.35 mm, 250 mg/ml produjo una media de 18.26 mm de los halos de inhibición sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

TERCERO:

La actividad antibacteriana *in vitro* de la clorhexidina al 0.12% produjo una media de 12.39 mm de halo de inhibición sobre cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

CUARTO:

El extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" a las concentraciones de 125 mg/ml y 250 mg/ml, tuvieron mejor efecto antibacteriano que la clorhexidina al 0.12%.

RECOMENDACIONES

PRIMERO:

Se recomienda para los estudiantes y egresados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica y la Facultad de Estomatología, elaborar una presentación farmacéutica a base de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" para el tratamiento antibacteriano de *Streptococcus mutans*.

SEGUNDO:

Se recomienda a los estudiantes y egresados de la Facultad de Estomatología, emplear el extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" frente a otros microorganismos patógenos de la cavidad oral.

TERCERO:

Se recomienda a los estudiantes y egresados de la Facultad de Estomatología, realizar pruebas "in vivo" en cavidad oral frente caries dental por *Streptococcus mutans*.

CUARTO:

Se sugiere a los estudiantes y egresados de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, realizar más estudios sobre productos naturales que tengan propiedades antibacterianas sobre microorganismos que puedan comprometer la salud física e integral de la población por infecciones de origen buco dental.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Henostroza Haro, Gilberto. Diagnóstico de caries Dental. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2005.
2. Juan Carlos Ojeda-Garcés, Eliana Oviedo-García, Luis Andrés Salas. Streptococcus mutans y caries dental. Revista CES Odontología [internet]. 2013 [citado 29 de diciembre 2017]; 26(1): 44-56. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
3. Malhotra N, Rao SP, Acharya S, Vasudev B. Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against Streptococcus mutans, Lactobacilli and Candida albicans. Oral Health Prev Dent [internet]. 2011 [citado 29 de diciembre 2017] ;9(3):261-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068182>
4. Khan S, Khan AU, Hasan S. Genotoxic assessment of chlorhexidine mouthwash on exfoliated buccal epithelial cells in chronic gingivitis patients. J Indian Soc Periodontol [internet]. 2016 [citado el 29 de diciembre 2017]; 20(6): 584-591. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29238137>
5. Thais Dayana Villagra Valdivia. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de Aloysia triphylla “cedrón” sobre Streptococcus mutans, universidad alas peruanas, Arequipa 2011. Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista, UAP-2011.
6. Ricardo A. Rojas Sarco. Eficacia antibacteriana in vitro del extracto de hoja de coca en comparación con clorhexidina frente a Staphylococcus y Streptococcus, Huánuco 2011. Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista, UDH-2011. Disponible en: <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/ricardoalbertorojassarco.pdf>
7. Jessica Flores Romero. Determinación de la actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray “arrayán” frente a Streptococcus mutans. Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista, UNMSM-2014. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3690/1/Flores_rj.pdf

8. Caqui Laguna, Sheyla Noris. Efecto inhibidor del extracto hidroalcohólico del *allium sativum* (ajo) a diferentes concentraciones en comparación al perio-aid® frente a cepas de *streptococcus mutans*. Estudio in vitro. Lima 2016. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista, Universidad Privada Norbert Wiener-2016. Disponible en:
http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/41924/1/T061_46730136_T.pdf
9. Organización Mundial de la Salud. Manual de Fitoterapia [Internet]. Ginebra: OMS; 2001 [citado el 29 de diciembre del 2017]. Disponible en:
<http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/fitoterapia.html>
10. Kember Mejía, Elsa Rengifo. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana. Lima: Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI), y el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), 2000. Disponible en: <http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/I017.pdf>
11. Papaver Rhoëas L. Libro blanco de los herbolarios y las plantas medicinales. Chile: Fundación Salud y Naturaleza (S.N.); 2007. Disponible en:
<https://www.fitoterapia.net/archivos/200701/260307libro-2.pdf?1>
12. María Dolores Juri, Laura Natalia Montero Hagen, Leonor Selena Gimelfarb, Maricel Ormeño, Analía Prosperi, Franco E. Chiarini. Usos de plantas medicinales y aromáticas silvestres Chilecito – Famatina. República de Argentina: Universidad Nacional de Chilecito-2012. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/301565040_Usos_de_plantas_medicinales_y_aromaticas_silvestres_Chilecito-Famatina_Primer_avance_del_Proyecto_Uso_sostenible_de_especies_nativas_de_valor_socio-economico_en_el_Valle_Antinaco-Los_Colorados_La_Rioj
13. Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa: La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. [Internet]. Ginebra: OMS; 2004 [citado el 29 de diciembre del 2017]. Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/>.
14. Organización Mundial de la Salud. Centro de prensa: Salud Bucodental. [Internet]. Ginebra: OMS; 2012. [Citado el 29 de diciembre del 2017] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>.

15. Luis Alejandro Aguilera Galaviz, Patricia Padilla Bernal, Rafael Aguilar Rodríguez, Silverio Frausto Esparza, Carmen Aceves Medina, Eduardo A. Enríquez Salaices Guillén. Niveles de *Streptococcus mutans* y prevalencia de caries dental en una población de escolares de la zona urbana de la ciudad de Zacatecas. *Revista de la Asociación Dental Mexicana* [internet]. 2004 [Citado el 29 de diciembre del 2017]; LXI (3):85-91. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2004/od043b.pdf>
16. Magda Elizabeth Graciano, Yuri Alexandra Correa, Cecilia María Martínez, Andrea Burgos, Julia Isabel Ceballos, Luisa Fernanda Sánchez. *Streptococcus mutans* y caries dental en América Latina. Revisión sistemática de la literatura. *Revista Nacional de Odontología* [Internet]. 2012 [Citado el 29 de diciembre del 2017]; 8(14):32-45. Disponible en: <https://revistas.ucc.edu.co/index.php/od/article/view/282/293>
17. Joel Nava Romero, Miguel Ángel Padilla Millán. Evaluación clínica del efecto de clorhexidina al 0.12% en la placa dentobacteriana, en estudiantes universitarios. *Ciencias de la Salud Humana* [Internet]. 1997 [Citado el 29 de diciembre del 2017]; 4(2):193-197. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5199060.pdf>
18. María Valentina Camejo Suárez. Sensibilidad In Vitro De *Streptococcus Mutans* a Sanguinarina, Compuesto Fenólico Y Clorhexidina. *Acta odontológica venezolana* [Internet]. 1999 [Citado el 29 de diciembre del 2017]; 37(2) [aprox. 6 pantallas]. Disponible en: https://www.actaodontologica.com/ediciones/1999/2/sensibilidad_in_vitro_streptococcus_mutans_a_sanguinarina_compuesto_fenolico_clorhexidina.asp
19. Modesto A, Drake DR. Multiple exposures to chlorhexidine and xilitol: Adhesion and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Current microbiology* [Internet]. 2006 [Citado el 29 de diciembre del 2017]; 52(6):418-23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16732449>
20. M. Naverac Aznar, P. de Grado Cabanilles, F. Gil Loscos. Uso de colutorios en la clínica periodontal. *Periodoncia y osteointegración* [Internet]. 2007 [Citado el 29 de diciembre del 2017]; 17(1):41-52. Disponible en: https://www.sepa.es/images/stories/SEPA/REVISTA_PO/articulos.pdf/17-1_04.pdf

21. Durbakula K, Prabhu V, Jose M. Genotoxicity of non-alcoholic mouth rinses: A micronucleus and nuclear abnormalities study with fluorescent microscopy. *J Investig Clin Dent* [Internet]. 2017, 15 de diciembre [Citado el 19 de diciembre del 2017]; 10.1111 [aprox.1 ventana]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29243408>
22. Iris Catiana Zampini, Norma Cudmani, María Inés Isla. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquím Clín Latinoam* [Internet]. 2007 [Citado el 19 de diciembre]; 41 (3): 385-93. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/535/53541313.pdf>
23. Roberto Davicino, María Aída Mattar, Yolanda Angelina Casali, Silvia Graciela Correa, Elisa Margarita Pettenati, Blas Micalizzi. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM 2007. *Rev. peru. biol.* [internet]. 2007 [Citado el 19 de diciembre]; 14(2):247-251. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v14n2/a11v14n02.pdf>
24. Carolina Silvia Monardez. Uso de extractos vegetales acuosos como estrategia alternativa para el control poscosecha de *Monilinia fructicola*, agente responsable de la podredumbre morena de los frutales de carozo. Mendoza- argentina 2014. Tesis para licenciatura en bromatología, UNCuyo-2014. Disponible en: http://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/6465/tesis-licenciaturabromatologia-monardez-2014.pdf
25. Viglianco A.I., R.J. Novo, C.I. Cragolini, M. Nassetta. Actividad de extractos crudos de *Larrea divaricata* Cav. Y *Capparis atamisquea* Kuntze sobre *Sitophilus oryzae* (L.). *Agriscientia* [Internet]. 2006 [Citado el 19 de diciembre del 2017]; XXIII (2):83-89. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/agrisc/v23n2/v23n2a05.pdf>
26. Figueroa-Gordon M, Acevedo AM, Alonso, Guillermina. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odontol. Venez.* [Internet]. 2009 [citado el 19 de diciembre del 2017]; 47(1) [aprox. 9 pantallas]. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652009000100026

27. Mónica Poveda Romero, Sergio Sánchez García, Eduardo Medina García, María Claudia Espinel Bermúdez, Enrique Ríos Szalay, José Arturo Fernández Pedrero. Gluconato de clorhexidina al 0.12% en la inhibición de la adherencia de *Streptococcus mutans* en restauraciones provisionales de polimetilmetacrilato in vitro. *Revista Odontológica mexicana* [Internet]. 2006 [citado el 19 de diciembre del 2017]; 10(1):24-29. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2006/uo061d.pdf>
28. Aguilera María C, Romano E, Ramos Norys, Rojas Laura. Sensibilidad del *Streptococcus mutans* a tres enjuagues bucales comerciales (Estudio in vitro). *Odous Científica* [Internet]. 2011 [Citado el 19 de diciembre del 2017]; 12(1):7-13. Disponible en: <http://132.248.9.34/hevila/ODOUScientifica/2011/vol12/no1/1.pdf>
29. Stege PW, Davicino RC, Vega AE, Casali YA, Correa S, Micalizzi B. Antimicrobial activity of aqueous extracts of *Larrea divaricata* Cav (jarilla) against *Helicobacter pylori*. *Phytomedicine* [Internet]. 2006 (Citado el 19 de diciembre del 2017) 13(9-10):724-7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085295>.
30. Cintia Mariana Romero, Cristian Germán Vivacqua, María Belén Abdulhamid, Mario Domingo Baigori, Alberto Carlos Slanis, María Cristina Gaudioso De Allori y María Laura. Tereschuk. Biofi Im inhibition activity of traditional medicinal plants from Northwestern Argentina against native pathogen and environmental microorganisms, *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2016 [Citado el 10 de febrero del 2018]; 49(6):703-712. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v49n6/0037-8682-rsbmt-49-06-00703.pdf>
31. Gómez-cansino rocio, guzmán-gutiérrez silvia laura, campos-lara maría guadalupe, espitia-pinzón clara inés y reyes-chilpa ricardo, natural compounds from mexican medicinal plants as potential drug leads for anti-tuberculosis drugs, *brasil* 2017: Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/aabc/v89n1/0001-3765-aabc-201720160298.pdf>
32. Hapon MV, JJ Boiteux, MA Fernández, G Lucero, MF Silva, PH Pizzuolo. Effect of phenolic compounds present in Argentinian plant extracts on mycelial growth of the plant pathogen *Botrytis cinerea* Pers. *Revista internacional de botánica experimental* [Internet]. 2017 [Citado el 10 de febrero del 2018]; 86: 270-277. Disponible en:

<http://www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar/vol86/Hapon.pdf>

33. Verónica Cuba Ventura, Marylia A. Saavedra Sánchez. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de *Larrea Divaricata* Cav. “jarilla” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, Arequipa 2011. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico, UCSM-2011.
34. Cañigueral S. Fitoterapia: concepto y ámbito de aplicación. Universidad de Barcelona. Valencia, 2009.
35. Sung Isabel. Plantas Medicinales. Lima, Editorial Isabel, 2000.
36. Atlas de las Plantas Medicinales y Curativas. La Salud a Través de las Plantas. Vol. 2 Madrid, Ediciones Cultural, 2004.
37. Mostacero Mejía Gamarra. Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. Vol. 1 Trujillo, Editorial Normas Legales, 2002.
38. Laura López, Carlos González. Viaje a San Juan [Internet]. 2006 [citado el 14 de marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.botanica.cnba.uba.ar/SanJuan.htm>
39. Dictionary of Botanical Epithets. *Divaricatissimus – Durior*. 2005 [citado el 14 de marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.winternet.com/~chuckg/dictionary/dictionary.79.html>
40. Soukup J. Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana. Lima, Editorial Colegio Salesiano, 1970.
41. Blanco María. Extracción Líquido Líquido. España, Universidad de Granada, Dpto. de Química Orgánica, 2004.
42. Valdizan, H. La Medicina Popular Peruana. IV Edición, Lima, Editorial Torres Aguirre, 1990.
43. Kuklinski. Claudia. Farmacognosia. Barcelona, Ediciones Omega. S.A.
44. Torres Tovar Humberto. Guía de prácticas de farmacognosia. Arequipa, U.C.S.M., 2006.
45. Torres M., Díaz M., Acosta A. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la estomatología. *Gaceta Médica Espirituana* 2009; 11(1).
46. Morante S. Valoración cruzada y a doble ciego, mediante el modelo de gingivitis experimental, de la eficacia de tres colutorios de clorhexidina sin alcohol frente a la prevención de gingivitis y a la neoformación de placa

- supragingival [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2003.
47. Lim K., Kam PCA. Chlorhexidine - pharmacology and clinical applications. *Anaesthesia and Intensive Care* 2008; 36(4), 502-12.
 48. Balandrano F. Soluciones para irrigación en endodoncia: Hipoclorito de Sodio y Gluconato de Clorhexidina. *Revista Científica Odontológica. CCDCR* 2007; Vol.3 No.1.
 49. Arrue M., Ibáñez L. Clorhexidina y Povidona Yodada. *Sesiones Clínicas de Ginecología* 2007 M.I.R. Edit. Unidad de comunicación del Hospital Donostia-Guatemala.
 50. Pomacóndor C. Papel de la clorhexidina en la odontología restauradora. *Odontología Sanmarquina* 2010; 13(2): 46-49.
 51. Yevenes I., Reyes J., Campos N., Saragoni V. Efecto inhibitorio en placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina. *Av Periodon Implanto*. 2003; 15, 1: 19-24.
 52. Garcia M. B., Carrilho M. R., Nör J.E., Anauate-netto, C., Anido-anido, A., Amore R., Tjäderhane L., Bretz W. A. Chlorhexidine inhibits the proteolytic activity of root and coronal carious dentin in vitro. *Caries Research* 2009; 43(2), 92-6.
 53. George A., Kalangi S., Vasudevan M., Krishnaswamy N. Chlorhexidine varnishes effectively inhibit porphyromonas gingivalis and streptococcus mutans - an in vivo study. *Journal of Indian Society of Periodontology* 2010; 14(3), 178-180.
 54. Alarcón P. Diagnóstico Microbiológico del Género Streptococcus. Laboratorio de Referencias Cocaceas Gran Positivas. Instituto de Salud Pública. Chile. 2011.
 55. Lamas M. Estudio de la colonización por estreptococos mutans y hábitos dietéticos durante la lactancia y primera infancia. [Tesis Doctoral]. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid; 2003.
 56. Emanuelsson I.R., Thornqvist E. Genotypes of mutans streptococci tend to persist in their host for several years. *Caries Res*, 2000. 34(2): p. 133-9.
 57. Masuda N., et al. Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of Streptococcus mutans in infants. *J Clin Microbiol*, 1979. 10(4): p. 497-502.

58. Svanberg M., Krasse B. Oral implantation of saliva-treated *Streptococcus mutans* in man. *Arch Oral Biol*, 1981. 26(3): p. 197-201.
59. Liébana J. *Microbiología Oral*. McGraw-Hill (eds), 1995. Cap. 15, pp. 220-239.
60. Stanke F., Urzúa I., Marine A. *Nuevas Estrategias en Cariología*. 2° Edición. Universidad de Chile. 2001. Cap.2, pp. 16-30.
61. Seki M., Yamahita Y., Torigoe H., Tsuda H., Maeno M. "Effect of mixed *Streptococcus mutans* colonization on caries development." *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:47-52.
62. Nakano K., Ooshima T. (2009). Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiology* 2009; 4(7), 891-902.
63. Sieber C. Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta. [Tesis para optar el título de Cirujano-Dentista]. Santiago, Chile: Universidad de Chile; 2012.
64. Real Academia Española, *Diccionario de la lengua española*. 23ª. ed. Madrid: Espasa, 2014.
65. Wikilengua del español. *Terminesp: actividad antibacteriana*. Disponible en: http://www.wikilengua.org/index.php/Terminesp:actividad_antimicrobiana
66. Aguilera L, Sánchez C, Neri C, Aceves M. *Streptococcus mutans* en saliva y su relación con caries dental. *Revista ADM*. 2009; Vol. LXV N°6.
67. Martínez M. Estudio de las cepas de *Streptococcus* del grupo *mutans* presentes en binomios madre-hijo. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. 2009; 21(2):177-85.
68. Camacho N, Goyenaga R, Echandi M, Valverde Tinoco A. Eficacia del gluconato de clorhexidina. *Revista Odontologica Vital [Internet]*. 2014 [citado 10 de febrero del 2018]; 1(20): 19-26. Disponible en: www.academia.edu/12158467/Odontología_Vital_20
69. Villar Del Fresno, Ángel María. *Farmacognosia General*. España, 2003.
70. Prescott Lasing M. *Microbiología*, IV edición, España, Editorial Mc Graw-Hill-Interamericana, S.A.U.; 1999.
71. Jave Márquez Mercedes. *Prácticas de Microbiología Farmacéutica*. Guía de Prácticas 2009.

ANEXOS

ANEXO N° 1

Ficha de recolección de datos: Concentraciones (mg/ml) y Halos de inhibición (mm)

ANTIBIOGRAMA		Concentraciones del extracto de las hojas de la “Jarilla”					Clorhexidina	Glicerina
<i>Streptococcus mutans</i>		7.8 mg/ml	15.6 mg/ml	31.2 mg/ml	125 mg/ml	250 mg/ml	1.2 mg/ml	-
Cultivo # 01	48 horas							
Cultivo # 02	48 horas							
Cultivo # 03	48 horas							
Cultivo # 04	48 horas							
Cultivo # 05	48 horas							
Cultivo # 06	48 horas							
Cultivo # 07	48 horas							
Cultivo # 08	48 horas							
Cultivo # 09	48 horas							
Cultivo # 10	48 horas							
Cultivo # 11	48 horas							
Cultivo # 12	48 horas							
Cultivo # 13	48 horas							
Cultivo # 14	48 horas							
Cultivo # 15	48 horas							
Cultivo # 16	48 horas							
Cultivo # 17	48 horas							
Cultivo # 18	48 horas							
Cultivo # 19	48 horas							
Cultivo # 20	48 horas							
Cultivo # 21	48 horas							

ANEXO N° 2

Constancia del Herbarium Arequipense (HUSA) del Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA 25- 2017-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Se hace constar que las muestras frescas de hojas, tallos, flores y frutos de la planta traída al laboratorio por el Sr. Adolfo Bárcena Pípara con DNI Nro. 47050966 para el análisis botánico corresponde a la especie *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" de la familia Zygophyllaceae. Dicha muestra fue obtenida de las laderas de Aplao en la provincia de Castilla Dpto. Arequipa, para el estudio de la Tesis de pregrado titulada: "COMPARACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO ENTRE EL EXTRACTO DE *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" y la CLORHEXIDINA AL 0.12% EN CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, AREQUIPA-2017" de la Escuela Profesional de Estomatología de la Universidad Alas Peruanas.

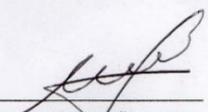
Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
ORDEN: ZIGOPHYLLALES
FAMILIA: ZIGOPHYLLACEAE
SUBFAMILIA: Larreoideae
GENERO: Larrea
ESPECIE: *Larrea divaricata* Cav.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 22 de Agosto del 2017




Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n mercado
Teléfono: (054) 237755 / 984248674
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA - PERÚ

ANEXO N° 3

Procesamiento del material vegetal

Recolección de la planta *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" en horas de la tarde en las laderas de Central - Aplao, Región Arequipa.



La planta vegetal fue trasladada a los laboratorios de la Universidad Alas Peruanas Filial Arequipa y se procedió al Lavado, secado y deshojado de la planta vegetal.





Hojas de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" se colocó en papel aluminio y fue sometida a 80 °C en una estufa por un periodo de 15 min para evitar la acción enzimática.



Una Vez terminado el proceso de deshidratación del material vegetal se procedio a su pulverización con la ayuda de un mortero y pistilo hasta la obtencion de particulas uniformes y a empaquerlos en cartuchos de papel filtro de 10 g de peso.



ANEXO N° 4

Método de extracción del extracto etanólico por Soxhlet

Se pesó 10 g de la hoja pulverizada de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla"



Se colocó el cartucho de 10 g en el sifón, 250 ml de etanol de 96° en el balón y se culminó en el armado del equipo colocando el refrigerante del equipo Soxhlet.



Se procedió a poner en marcha el proceso de extracción, previo control de la temperatura de 75°C - 85°C



ANEXO N° 5

Determinación del porcentaje de rendimiento de la extracción

Para determinar el porcentaje de rendimiento se requiere eliminar el solvente etanol de 96°, para ello se empleó el método de destilación.



Se procede a pesar los Beaker para luego restar la diferencia del peso.



Se eliminó el etanol a baño maría, controlando la Temperatura de 75 – 85 °C.



Se eliminó todo el etanol a sequedad total y se pesó nuevamente los Beaker junto con el extracto puro de *Larrea divaricata*.



De las 3 repeticiones que se realizó con el método de extracción por Soxhlet, tenemos los siguientes datos para hallar el porcentaje de rendimiento:

- 10g +10g +10g = 30g (peso total de las hojas secas trituradas homogéneamente)
- 21.1050g + 35.0027g + 35.3453g = 91.453g (peso del Beaker)
- 24.9345g + 38.9782g + 40.1536g = 104.0663g (peso del Beaker + Jarilla pura)
- 104.0663g – 91.453g = 12.6133 (peso del extracto seco de la Jarilla)

Fórmula para hallar el porcentaje de rendimiento:

$$\%RE = \frac{\text{Peso de Extracto seco} \times 100}{\text{Peso de las hojas secas}}$$

$$\%RE = \frac{12.6133 \text{ g} \times 100}{30 \text{ g}}$$

$$\%RE = 42.04$$

$$\%RE = 42.04$$

ANEXO N° 6

Adquisición de la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC 25175 de GenLab del Perú S.A.C.



GenLab
del Perú SAC
Tecnologías para la Vida

RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima, Lima - PERU (Alt. Cdra. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)
Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Lurigancho, Lima, Lima
Central Telef.: 203-7500 Telefax: (51-1) 203-7501
e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

R.U.C. 20501262260

FACTURA

Factura N°: 0020018760

0002- N° 0018760

Fecha	Vencimiento	Condiciones de Pago	A.C.
19/07/2017	19/07/2017	CONTADO	

Sr(es): UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS
 Dirección: AV SAN FELIPE 1109 - JESUS MARIA LIMA LIMA
 R.U.C. 20303063766 N° de Guía de Remisión
 N° de O.C.: Att: N° Pedido Ped N°: 017163

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
H05666-A	KWIK-STIK™ Streptococcus mutans derived from ATCC® 25175™*	1	280,59000	280,59

PEPEGRAF S.A. R.U.C. 20372514290 SERIE 0002 DEL 18001 al 10000 SUNAT N° 12749733023 F.I.: 03-02-2017

<p>SON: TRESCIENTOS TREINTA Y UNO CON 10/100 S/00</p> <p>O/P: NOTA : DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO DE CANCELACIÓN, SE RECARGARA EL INTERES LEGAL POR EL TIEMPO QUE TRASCURRA PARA LA CANCELACIÓN DE ESTA FACTURA. LOS CHEQUES DEBERÁN SER GIRADOS ÚNICA Y EXCLUSIVAMENTE GEN LAB DEL PERU S.A.C.</p>	<p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: large;">CANCELADO / CANJEADO</p> <p style="text-align: center;">Lima, 19 de 07 de 2017</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: x-large;">GEN LAB DEL PERU SAC</p> <p style="text-align: center; font-weight: bold; font-size: x-large; color: red;">CANCELADO</p> <p style="text-align: center; font-size: x-small;">GEN LAB DEL PERU S.A.C.</p>
	<p style="text-align: right;">SUB TOTAL S/ 280,59</p> <p style="text-align: right;">I.G.V. (18) S/ 50,51</p> <p style="text-align: right;">TOTAL S/ 331,10</p>

ADQUIRENTE O USUARIO



RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima - PERU (Alt.Cdra. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)
Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Luigancho, Lima, Lima
Central Telf.: 203-7500 Telefax:(51-1) 203-7501
e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

R.U.C. 20501262260

GUIA DE REMISION
REMITENTE

0002- N° 0025409

Table with 2 columns: Fecha, Comprobante de Pago N°

Sr(es): UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS

AV SAN FELIPE 1109
JESUS MARIA LIMA LIMA

Punto de Llegada: OLYA COURIER AREQUIPA

Punto de Partida: AV. LAS FLORES DE PRIMAVERA # 847 - LIMA 36

R.U.C.:

20303063766

Cod. Cliente:

95

Ped N°: 01716

Orden de Compra:

Numero de Pedido:

021908

Tipo de Movimiento:

Fecha de Traslado:

08/08/2017

Table with 1 column: Unidad de Transporte y Conductor

Table with 1 column: Empresa de Transporte

Marca y Placa :
N° Licencia de Conducir :

Sr(es):
R.U.C.:

MOTIVO DEL TRASLADO

Ventas (X) Compras () Consignación () Ventas con Entrega a Terceros () Ventas Sujeta a Confirmación por el Proveedor () Traslado entre Establecimientos de la misma Empresa () Devolución () Otros ()

Main table with columns: COD., CANT., UNIT., DESCRIPCION

PEPEGRAF. S.A. R.U.C. 20372514290 SERIE 0002 DEL 24051 al 25950 SUNAT N° 12009444023 F.I.: 19-05-2017

BIENES TRANSPORTADOS :

Una vez recepcionada la mercadería no habrá lugar a devoluciones.

Firma y Sello

A.C.
55

p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.
Despachador

Handwritten signature

p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.
Almacén

RECIBI CONFORME

DESTINATARIO

ANEXO N° 7

Protocolo de seguridad brindada por GenLab del Perú S.A.C.

HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD

SDS.204



KWIK-STIK™, KWIK-STIK™ Plus y Lab-Elite™ CRM Hydrating Fluid

SECCIÓN 1: IDENTIFICACIÓN

KWIK-STIK™, KWIK-STIK™ Plus y Lab-Elite™ CRM Hydrating Fluid
Microbiologics, Inc.
200 Cooper Avenue North
St. Cloud, Minnesota 56303 USA
320-253-1640

SECCIÓN 2: INSTRUCCIONES SOBRE RIESGOS

Clasificación según los Sistemas Generales de Salud: Irritante para los ojos (Categoría 2)

Palabra indicadora: Advertencia

Pictograma:



Indicación de Peligro: H319: Causa irritación grave a los ojos.

Notas de Advertencia: P264: Lávese bien las manos después de manipularlo.
P280: Use protección para las manos, el cuerpo, los ojos y el rostro.
EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuague bien con agua durante varios minutos. Retírese las lentillas si usa y no le resulta difícil y continúe enjuagando. Si persiste la irritación: Busque atención médica.

Punto de Ebullición: N/A

Presión de Vapor: N/A

Densidad de Vapor: N/A

Solubilidad en Agua: N/A

Gravedad Específica: N/A

Porcentaje de Volatilidad: N/A

Tasa de Evaporación: N/A

Clasificación según los Sistemas de Identificación de Materiales Peligrosos: Riesgos para la Salud: 2
Inflamabilidad: 0
Riesgos Físicos: 0

SECCIÓN 3: COMPOSICIÓN E INFORMACIÓN SOBRE LOS INGREDIENTES

Cada barra naranja contiene un depósito de líquido hidratante. El líquido hidratante consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, fosfato monopotásico, fosfato disódico, tioglicolato de sodio y agua desionizada.

SECCIÓN 4: MEDIDAS DE PRIMEROS AUXILIOS

Ojos: Enjuague bien con agua durante varios minutos. Si usa lentillas retíre las si no le resulta difícil y continúe enjuagando. Si persiste la irritación: Busque atención médica.

SECCIÓN 5: MEDIDAS CONTRA INCENDIOS

N/A

SECCIÓN 6: MEDIDAS CONTRA LA LIBERACIÓN ACCIDENTAL

En caso de que no se haya hidratado la preparación de microorganismos liofilizados, no necesita hacer nada. En caso de que se haya hidratado la preparación de microorganismos liofilizados, consulte la Sección LIT.115, Limpieza de Riesgo Biológico en nuestra página de internet www.microbiologics.com
→ Centro de Soporte → Biblioteca de Documentos → Información Complementaria.

SECCIÓN 7: MANEJO Y ALMACENAMIENTO

Almacene el producto entre 2°C y 8°C en su recipiente sellado original.

El líquido hidratante es un líquido estéril y, por sí mismo, no supone ningún riesgo. Cuando usa el líquido hidratante para hidratar la preparación de microorganismos liofilizados crea una suspensión que contiene microorganismos, los cuales, bajo ciertas condiciones, pueden provocar un proceso infeccioso.

Debe emplear las técnicas apropiadas para evitar la exposición y el contacto con el crecimiento de microorganismos y las suspensiones con microgránulos rehidratadas. El laboratorio de microbiología debe estar equipado con las instalaciones para recibir, procesar, mantener, almacenar y disponer de material con riesgo biológico. El personal del laboratorio de microbiología que usa estos dispositivos debe estar capacitado y contar con experiencia y dominio en el procesamiento, mantenimiento, almacenamiento y desecho de material con riesgo biológico.

SECCIÓN 8: CONTROLES CONTRA LA EXPOSICIÓN Y EQUIPO DE PROTECCIÓN PERSONAL

Protección de las Vías Respiratorias: El líquido hidratante que se usa junto con la preparación de microorganismos liofilizados indica que los procedimientos operativos estándar de cada laboratorio deben dictar el uso de gabinetes de bioseguridad y la indicación de

Ropa de Protección: El líquido hidratante que se usa junto con la preparación de microorganismos liofilizados indica que los procedimientos operativos estándar de cada laboratorio deben dictar el uso de guantes, delantales impermeables y otro tipo de ropa de protección.

SECCIÓN 9: PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

Solución acuosa transparente, incolora.

SECCIÓN 10: ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

El producto es estable si se cumplen las condiciones de almacenamiento apropiadas.

SECCIÓN 11: INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA**Información sobre los Efectos Toxicológicos:**

Toxicidad Aguda:	DL50 Oral en ratas: 2,301 mg/kg (Lineamientos de Pruebas de la OCDE 401) Inhalación: no hay datos disponibles Dérmica: no existen datos disponibles
Corrosión o Irritación Dérmica:	Piel: conejo Resultado: No hay irritación en la piel
Daños Graves o Irritación en los Ojos:	Ojos: conejo Resultado: Irritación moderada en los ojos (Lineamientos de Pruebas de la OCDE 405)
Sensibilización en las Vías Respiratorias o la Piel:	No existen datos disponibles
Mutagenicidad de células germinales:	Rata Síntesis de ADN no programada
Carcinogenicidad:	Instituto Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, Conferencia Estadounidense de Higienistas Industriales a Nivel Gubernamental, Programa Nacional de Toxicología y Ley de Salud y Seguridad Nacional: No existe indicación de probabilidad, posibilidad o confirmación de que los
Toxicidad Reproductiva:	No existen datos disponibles
Toxicidad para Órganos Específicos - Exposición Única:	No existen datos disponibles
Toxicidad para Órganos en Específico - Exposición Repetida:	No existen datos disponibles
Riesgos por Aspiración:	No existen datos disponibles

SECCIÓN 12: INFORMACIÓN ECOLÓGICA

Toxicidad en Peces:	CL50: Lepomis macrochirus - 10,650 mg/l - 96 h
Toxicidad en Daphnia y Otros Invertebrados Acuáticos:	CE50: Daphnia magna (pulga de agua) - 2,400 mg/l - 48 h (Lineamiento de Pruebas) de la OCDE 202)

SECCIÓN 13: INSTRUCCIONES DE DESECHO

El líquido hidratante es un líquido estéril y, por sí mismo, no supone ningún riesgo. Cuando usa el líquido hidratante para hidratar la preparación de microorganismos liofilizados crea una suspensión que contiene microorganismos, los cuales, bajo ciertas condiciones, pueden provocar un proceso infeccioso.

Los materiales liofilizados, las suspensiones microgranuladas rehidratadas y el crecimiento subsiguiente de estos microorganismos en medios de cultivo se consideran material de riesgo biológico. Las agencias y los estatutos regulan la forma de desechar los materiales con riesgo biológico. Cada uno de los laboratorios debe estar al tanto de la forma correcta de desechar materiales con riesgo biológico y cumplir con dichos lineamientos.

SECCIÓN 14: INFORMACIÓN DE TRANSPORTACIÓN

Debido a que el líquido hidratante está contenido en una unidad que también contiene microgránulos de microorganismos liofilizados, consulte las regulaciones nacionales e internacionales relacionadas con el embarque y el transporte de materiales con riesgo biológico. Clasificación según las Naciones Unidas Sustancia Biológica UN3373 Categoría B de microgránulos de microorganismos liofilizados de Microbiologics. Se pueden enviar ciertos números de catálogo de Microbiologics de conformidad con la Sección UN2814, Sustancias Infecciosas. Consulte la sección TIB.2023 Cepas Enviadas UN2814 para ver una lista completa de los microorganismos enviados de conformidad con la UN2814.

SECCIÓN 15: INFORMACIÓN REGULATORIA

N/A

SECCIÓN 16: OTRA INFORMACIÓN

N/A

ANEXO N° 8

Preparación del material biológico

Preparación de los medios de cultivo BHI y Mitis Salivarius, para la activación de las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



Se esterilizaron los medios de cultivos preparados y de los materiales a usar.



Activación de las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en caldo BHI y agar MS.



ANEXO N° 9

Coloración Gram

Se colocó una azada de *S. mutans* sobre una lámina limpia de portaobjetos y se preparó todo para la tinción Gram.



Se realizó la coloración Gram: solución de cristal violeta (1 min.), lugol (1min.), acetona (10 seg.) y safranina (1 min.).



Se observó al microscopio a 40 x



ANEXO N° 10

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se preparó el extracto madre diluyendo 2.5 g del extracto puro de *Larrea divaricata* Cav. “Jarilla” en 10 ml de glicerina.



Para la preparación del inóculo se alistó en un tubo de ensayo, se añadió 10ml de BHI a una turbidez del medio semejante a la del tubo N° 0.5 de la escala de McFarland el cual equivale a 10^8 UFC/ml y se dejó incubar por 24 horas.



Se realizó una dilución de 1:100 del inóculo; es decir se tomó 0.1 ml del inóculo de 10^8 UFC/ml y este se vertió en 9.9 ml de caldo BHI que ya contenía en un tubo de ensayo; de esta manera obtenemos una solución del inóculo de 10^6 UFC/ml el cual será empleado para hallar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). En la que se prepararon 12 tubos de ensayo con cada concentración (se explica en el marco teórico), se halló una CIM de 0.97 mg/ml para *S. mutans* ATCC 25175.



Anexo N° 11

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

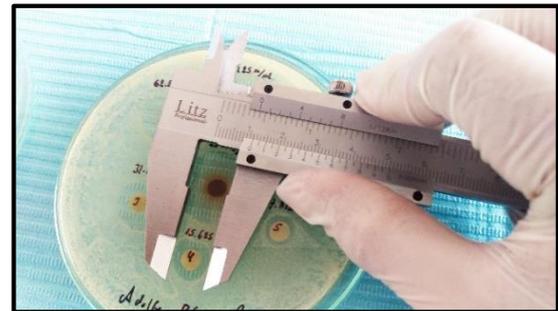
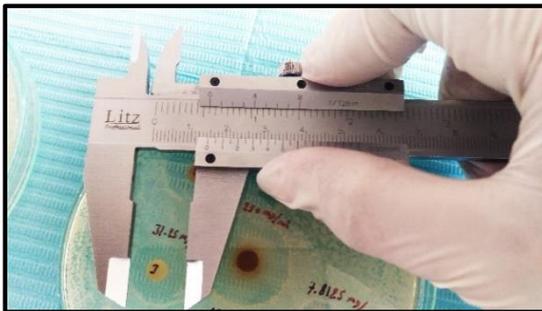
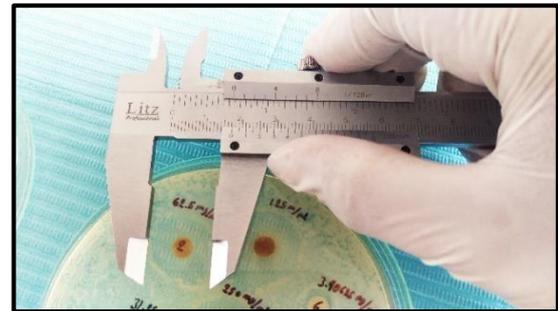
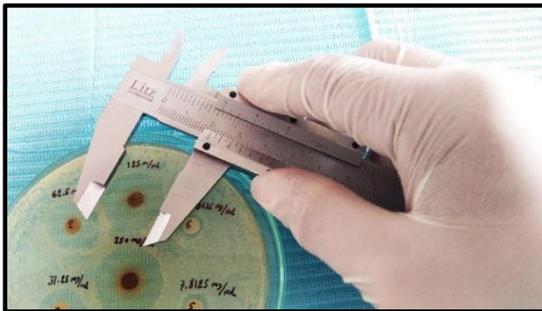
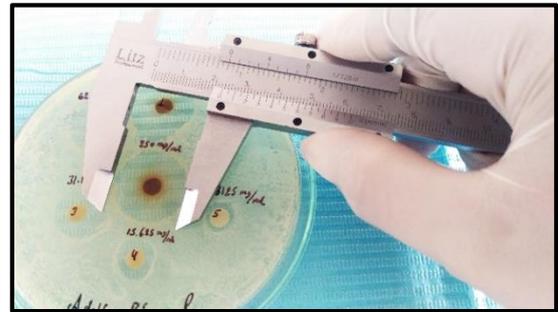
Se sembró en Agar nutritivo todos aquellos tubos, y se incubó por 24 horas a 37°C, se observó el crecimiento bacteriano en las placas, luego se procedió a indicar el punto de ruptura, dando una CBM de 3.90 mg/ml (Tubo N° 6).



ANEXO N° 12

Prueba piloto

Se preparó las concentraciones y se colocaron los discos para observar el efecto antibacteriano. En esta imagen se evidencia que el efecto antibacteriano mientras mayor es la concentración mayor es el efecto.



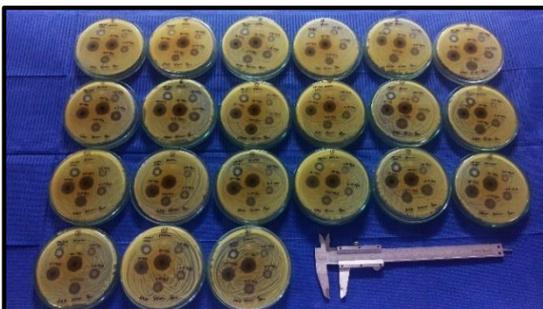
ANEXO N° 13

Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

Se sembró en 21 placas de Petri contenidas con agar Müller-Hinton, y se colocaron los discos con el extracto de *Larrea divaricata* Cav. "Jarilla" en diversas concentraciones, la clorhexidina al 0.12% y la glicerina y se expusieron a la incubadora por 48 horas.



Después de 48 horas se procedió hacer la lectura de los diámetros de los halos de inhibición con la regla milimetrada Vernier.



ANEXO N° 14

Matriz de consistencia de datos: Concentraciones (mg/ml) y halos de inhibición (mm)

ANTIBIOGRAMA		Concentraciones del extracto de las hojas de la “Jarilla”					Clorhexidina	Glicerina
<i>Streptococcus mutans</i>		7.8 mg/ml	15.6 mg/ml	31.2 mg/ml	125 mg/ml	250 mg/ml	1.2 mg/ml	-
Cultivo # 01	48 horas	7.1	9.9	12	16.6	18.7	11	-
Cultivo # 02	48 horas	9	11.6	11.1	16.1	18	10.6	-
Cultivo # 03	48 horas	9.4	12.7	13.4	17.1	20.4	12	-
Cultivo # 04	48 horas	10	11.7	11.3	15.3	17.8	10.6	-
Cultivo # 05	48 horas	9.8	12.2	13	15.5	18.3	12.5	-
Cultivo # 06	48 horas	10	12.8	15.8	18.5	19.3	13.3	-
Cultivo # 07	48 horas	9.8	13.6	12.2	16.4	18.7	12.6	-
Cultivo # 08	48 horas	10.5	13.3	13.7	17.8	19	13.8	-
Cultivo # 09	48 horas	8.8	10.6	15.4	15.5	17.6	13.3	-
Cultivo # 10	48 horas	6.9	10.6	12.1	15	17.8	11.7	-
Cultivo # 11	48 horas	9.9	11.2	15.4	17.3	18.1	13.8	-
Cultivo # 12	48 horas	6.9	11.4	14.7	16.2	18	12.5	-
Cultivo # 13	48 horas	7.4	10.3	14	16.3	17.5	12	-
Cultivo # 14	48 horas	7.5	9	11.3	16.2	17.2	10.5	-
Cultivo # 15	48 horas	7.2	8.5	11	17	18.3	12.8	-
Cultivo # 16	48 horas	8.1	9.4	12	16.3	18	13.3	-
Cultivo # 17	48 horas	8.8	13.5	13.3	17.2	18.3	14	-
Cultivo # 18	48 horas	7.5	10.9	13	16.5	18.3	13.6	-
Cultivo # 19	48 horas	7.8	10.7	12.8	15	17.9	11	-
Cultivo # 20	48 horas	7.5	9.5	11.5	16	19.2	12.5	-
Cultivo # 21	48 horas	7.4	9.4	11.5	15.6	17.2	12.8	-