



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

TESIS

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL
Schinus molle L. SOBRE LAS CEPAS DE Streptococcus mutans
ESTUDIO IN VITRO. AREQUIPA, 2018.**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

PRESENTADO POR:

BACHILLER SOLANGE GRACIA PAZ CALCIN QUISPE

ASESOR:

DRA. SANDRA CLARA ALICIA CORRALES MEDINA

AREQUIPA, PERÚ

NOVIEMBRE 2018

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a mi padre celestial, el forjador de mi camino que me acompaña y siempre me levanta de mis tropiezos.

A mis padres por todo su apoyo, sacrificio, esfuerzo y confianza por darme una carrera, creer en mí, aunque pasamos por momentos difíciles y siempre permanecieron a mi lado, brindándome su comprensión, cariño y amor.

A cada uno de mis hermanos, quienes con sus palabras de aliento no me dejaron decaer.

AGRADECIMIENTO

A la Facultad de Ciencias Biológicas Departamento Académico de
Biología de la Universidad Nacional de San Agustín.

Al Mg. Cesar Augusto Ranilla Falcón, por el apoyo para la
realización de mi tesis.

Agradezco de manera especial a mi asesora: Dra. Sandra Clara
Alicia Corrales Medina, por su comprensión, apoyo y tiempo
brindado.

RESUMEN

El trabajo de investigación tuvo como objetivo; determinar la eficacia antimicrobiana in vitro del aceite esencial del *Schinus molle L.* en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, considerando que este microorganismo es uno de los más evidentes en la flora bucal

El estudio fue experimental *in vitro*, se utilizó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, la cual se reactivó sembrándola en caldo Bra in Heart Infusión (BHI); una vez reactivada, se sembró en agar base sangre en 11 placas de Petri; sobre el cual se colocó discos de papel filtro impregnados con el aceite esencial del *Schinus molle L.* con las siguientes concentraciones: 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, y clorhexidina al 0,12% (control positivo) y agua destilada como (control negativo) También se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) en caldo BHI, Los resultados nos revelaron que el aceite esencial de *Schinus molle L.* a la concentraciones de 100% provocó un halo de inhibición de 9.55mm; al 75% un halo de inhibición 8.34mm; al 50% tiene un halo de 7.5 mm y para la concentración 25% evidencia un halo de 7.00 mm, mientras que en la muestra de control positivo hubo un halo 11.42mm y para el agua destilada no hubo presencia actividad antibacteriana. Además la concentración mínima inhibitoria (CIM) fue 6.87 mg/ml. Los resultados obtenidos permite concluir que el aceite esencial del *Schinus molle L.* en las concentraciones de 100% y 75% tuvo mayor efecto antibacteriano para *Streptococcus mutans*.

Asimismo la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue de 6.87mg/ml.

Palabras claves: Actividad antibacteriana; aceite esencial del *Schinus molle L.* clorhexidina, *Streptococcus mutans*.

SUMMARY

The objective of the research work was to: Determine the in vitro antimicrobial efficacy of the essential oil of *Schinus molle* in strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, considering that this microorganism is one of the most evident in the oral flora

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 blood-based agar in 11 Petri dishes; on which filter paper discs impregnated with the essential oil of *Schinus molle* L. were placed with the following concentrations: 25%, 50%, 75%, 100%, and 2% chlorhexidine (positive control) and distilled water as (negative control) The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) in BHI broth was also determined.

The results revealed that the essential oil of *Schinus molle* L. in the concentrations of 100% caused the inhibition halo of 9.55mm; at 75% an inhibition halo 8.34mm; at 50% it has a halo of 7.5 mm and for 25% it has a halo of 7.00 mm, while in the positive control sample there was an 11.42 mm halo and for the distilled water there was no antibacterial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 6.87 mg / ml.

The results obtained could be concluded that, the essential oil of *Schinus molle* L. in the concentrations of 100% and 75% had greater antibacterial effect for *Streptococcus mutans*.

Likewise, the minimum inhibitory concentration (MIC) was 6.87mg / ml.

Key words: Antibacterial activity, essential oil of *Schinus molle* L. chlorhexidine, *Streptococcus mutans*.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
RESUMEN	III
SUMMARY	IV
INDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	IX
INTRODUCCIÓN	X
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	2
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	5
1.3 OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN	6
1.3.1 Objetivo Principal.....	6
1.3.2 Objetivos Específicos	6
1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
1.4.1 Importancia de la investigación	6
1.4.2 Viabilidad de la investigación	8
1.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO	9
CAPÍTULO II: MARCO TEORICO	10
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
2.1.1. Antecedentes Internacionales.....	11
2.1.2. Antecedentes Nacionales	11
2.1.3. Antecedentes Locales.....	12
2.2. MARCOTEÓRICO	13
2.2.1. Schinus molle L. (molle)	13
2.2.1.1. Floración y fructificación	14
2.2.1.2. Nombre común	15

2.2.1.3. Clasificación botánica	15
2.2.1.4. Composición química de la corteza, hojas y frutos del molle	16
2.2.1.5. Propiedades medicinales.....	17
2.2.2. Aceite esencial	17
2.2.2.1 Clasificación de los aceites esenciales	21
2.2.2.2. Características físicas de los aceites esenciales.....	20
2.2.2.3. Características químicas de los aceites esenciales (terpenoides).....	20
2.2.3. Extracción del aceite esencial.....	23.
2.2.3.1 Extracción por destilación por arrastre de vapor.....	23.
2.2.4. Clorhexidina	24
2.2.4.1. Propiedades de la clorhexidina.....	24
2.2.4.2. Indicaciones.....	24
2.2.4.3. Contraindicaciones	25
2.2.4.4. Ventajas.....	25
2.2.4.5. Desventajas	25
2.2.5. Streptococcus mutans	25
2.2.5.1. Taxonomía.....	28
2.2.5.2.Estructura celular.....	29
2.2.5.3. Factores de virulencia	30
2.2.5.4. Hábitat	34
2.3. Definición de términos básicos.....	34
CAPÍTULO III:HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN.....	36
3.1 Formulación de la hipótesis principal y derivadas	37
3.1.1. Hipótesis principal:	37
3.1.2. Hipótesis derivadas	37
3.2. VARIABLES; DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL	37

CAPÍTULO IV:METODOLOGÍA	38
4.1 DISEÑO METODOLÓGICO.....	39
4.1.1 Tipo de estudio	39
4.1.2. Diseño de investigación.....	39
4.1.2.1. De acuerdo a su temporalidad.....	39
4.1.2.2. De acuerdo al lugar de recolección de datos.....	39
4.1.2.3. De acuerdo al momento de la recolección de datos.....	39
4.1.2.4. De acuerdo a la finalidad de la investigación.....	39
4.2 DISEÑO MUESTRAL.....	40
4.2.1Criterios de inclusión:.....	40
4.2.2. Criterios de exclusión:.....	40
4.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	40
4.4. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	46
4.5. ASPECTOS ÉTICOS	46
CAPÍTULO V:ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	47
5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO, TABLAS DE FRECUENCIA, GRÁFICOS, DIBUJOS, FOTOS, TABLAS, ETC	48
5.2. ANALISIS INFERENCIAL.....	59
5.3. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS, TÉCNICAS ESTADÍSTICAS EMPLEADAS	61
5.3.1. Hipótesis principal:.....	61
5.3.2. Hipótesis derivadas.....	61
5.4. DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES	65
FUENTES DE INFORMACIÓN	66
ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L. al 100% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> a las 48 horas.....	48
TABLA N° 2: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L. al 75% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> a las 48 horas	50
TABLA N° 3: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L. al 50% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> a las 48 horas.....	52
TABLA N° 4: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L. al 25% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> a las 48 horas.....	54
TABLA N° 5: Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> del aceite esencial del <i>Schinus molle</i> L. en las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> a las 48 horas.....	56
TABLA N° 6: Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L.” sobre cepas de <i>Streptococcus mutans</i>	58
TABLA N° 7: Prueba de análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de las concentraciones del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L. sobre el <i>Streptococcus mutans</i>	60
TABLA N° 8: Prueba t de Student para comparar la actividad antibacteriana de la clorhexidina al 0.12% con las concentraciones del aceite esencial <i>Schinus molle</i> L.” sobre el <i>Streptococcus mutans</i>	61

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- GRÁFICO N° 1:** Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Schinus molle* L. al 100% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas 49
- GRÁFICO N°2:** Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Schinus molle* L. al 75% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas 51
- GRÁFICO N° 3:** Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Schinus molle* L. al 50% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas 53
- GRÁFICO N° 4:** Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Schinus molle* L. al 25% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas 55
- GRÁFICO N° 5:** Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial del *Schinus molle* L. en las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas . 57

INTRODUCCIÓN

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, cede iones calcio y fosfato que alteran la estructura cristalina de la hidroxiapatita, tornándola más susceptible a ser remineralizada, si no continua la producción de ácidos después de 30 a 45 minutos, el pH sube y los minerales en forma iónica, tienden a incorporarse a la estructura dentaria. La irreversibilidad se da cuando la cantidad de cristales removidos, ocasiona el colapso de la matriz de proteína estructural. Este proceso se conoce como desmineralización la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto de metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria.

La caries es una enfermedad infecciosa y transmisible de los dientes, que se caracteriza por la desintegración progresiva de sus tejidos calcificados

Son muchos los productos que se utilizan para controlar o disminuir la carga bacteriana de microorganismos patógenos en este caso en relación a la caries dental entre ellos la clorhexidina, que en la actualidad es el medicamento elegido por cirujanos dentistas, como enjuague tiene un excelente efecto antibacteriano contra los *Streptococcus mutans*; es genotóxico para las células epiteliales a medida que prolongamos el uso en el tratamiento odontológico. Sin embargo el auge de la medicina naturista o estimulando por numerosos trabajos de investigación están proponiendo el uso de productos naturales por sus propiedades antibacterianas, más aun frente a los *Streptococcus mutans*. 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. En ese sentido el Perú es un país privilegiado ya que posee una gran variedad de especies

vegetales con propiedades medicinales. Así como en toda América, de hecho, algunos estudios señalan propiedades de plantas para problemas en específico.

El conocimiento y la utilización de la fitoterapia definida como el uso de los productos de origen vegetal, es más frecuente, incluso está profundamente difundida y arraigada en las distintas regiones del Perú, el *Schinus molle* L. se aplica en tratamiento de enfermedades relacionadas al *Streptococcus mutans*, además los españoles en el Perú encontraron que *Schinus molle* L. ha sido utilizado en diferentes patologías en la medicina indígena y su efecto terapéutico se debe al contenido de químicos (metabólicos primarios y secundarios) denominados principios activos de los vegetales.

Por lo tanto, el propósito del presente estudio es observar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *Schinus molle* L. en cepas de *Streptococcus mutans* teniendo como control positivo la clorhexidina y como control negativo agua destilada, para disponer de una alternativa naturista que ayude a disminuir el riesgo de caries a través del control de la carga bacteriana.

CAPÍTULO I:
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Existen diferentes formas de observar la realidad del mundo de las enfermedades infecciosas como cantidad de agentes patógenos que las provocan. Durante la mayor parte de la existencia de la humanidad han sido una causa predominante de enfermedad y de muerte, que no solo han restringido el bienestar de las personas sino que, además han cercenado la prosperidad social.

A partir del siglo XX las mejoras en las condiciones de vida, la sanidad y las intervenciones médicas permitieron alcanzar un avance, para que las sociedades desarrolladas emergieran de la devastación provocadas por las enfermedades infecciosas, estos progresos se observaron en los países de primer mundo, sin embargo las enfermedades infecciosas en la actualidad ocupan un lugar importante en los países en vías de desarrollo.

La caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de las biopelículas que se forman naturalmente, la (OMS), manifiesta que la caries dental por sus altos niveles de prevalencia es un problema de salud pública debido a que casi el 100% de las personas la presentan. En el Perú, por medio de estudios epidemiológicos desarrollados por el Ministerio de Salud (MINSA), en el año 2017 se dio a conocer la prevalencia de caries dental, llegando al 85% de la población.

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente. Como se sabe, la caries dental es un proceso patológico infeccioso, multifactorial, localizado, pos eruptivo y transmisible que destruye los tejidos duros dentales. Los principales microorganismos asociados a la producción de caries son en orden de frecuencia: 1. *S. mutans* (principalmente el serotipo c) y en menor proporción *S. sobrinus* *S. gordonii*; y 2. Especies de *Lactobacillus* y *Actinomyces*⁽²⁴⁾.

El hecho de reconocer a *S. mutans* como el microorganismo más importante en la iniciación de la caries, conduce a diseñar medidas de

prevención dirigidas hacia la eliminación o disminución de éste en cavidad oral. En la aplicación del control microbiológico sobre *S. mutans* es importante tener en cuenta: 1. Aspectos ecológicos orales y, 2. eventos en la formación de la caries susceptibles de intervenir⁽¹⁹⁾.

En México en el 2004 se publicó 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.⁽²³⁾

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 inhibitor significativo en la actividad de las enzimas proteolíticas que generan caries dentinaria.⁽⁵⁰⁾

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.

Los científicos en la actualidad promueven el uso de la fitoterapia o medicina natural; este es el caso de *Schinus molle* el cual se encuentra ampliamente distribuido en el noroeste, centro y sudeste de Argentina así

como también en las regiones áridas del Perú, Arequipa (circunscritas la Joya) y Moquegua; tiene propiedades antibacterianas, antimicóticos, analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes. Entonces la principal bacteria que da inicio y progreso de la caries dental, es el *Streptococcus mutans*.

Se describe la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto de metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, las bacterias orales permanecen en una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana, inicio para el proceso de desmineralización.

El *Streptococcus mutans* es el agente más importante asociado a la caries dental, el estado de la salud bucal, el papel que juega el *S. mutans* y la acumulación de placa dental en el desarrollo de caries son factores muy importantes de análisis, constituyéndose como factores de riesgo, para el desarrollo de ésta.

Siendo el *S. mutans*, es el principal implicado en el desarrollo de esta enfermedad, es necesario investigar métodos efectivos, inmediatos, fáciles de conseguir y de bajo costo, para disminuir sus efectos patógenos de este modo disminuir la prevalencia de caries dental.

En estos tiempo se observa un incremento en el uso de productos naturales y la creciente desconfianza hacia los productos sintéticos, nos obliga a proponer el uso de sustancias accesibles en zonas rurales del país, en busca de productos cuyo impactó sobre el medio ambiente sea menor, de origen natural o con pocas modificaciones industriales, prevenir y disminuir la concentraciones de *Streptococcus mutans* y disminuir el riesgo de contraer la enfermedad.

La región andina del Sudamérica, principalmente Perú, Chile y Ecuador cuenta con una gran diversidad vegetal, en el Perú la existencia de una gran biodiversidad botánica, La importancia del uso de las plantas medicinales en la medicina tradicional ha sido conocida por la OMS refiriéndose de muchos países en vías de desarrollo. Por un lado, y los

conocimientos incipientes de sus propiedades fitoquímicas, El *Schinus molle* L. es una especie vegetal muy difundida en el Perú, siendo su desarrollo óptimo en los climas cálidos y secos teniendo como uso las hojas como antirreumático, cicatrizantes en la limpieza bucal, digestivo expectorante.

El aceite esencial natural contiene sustancias responsables del aroma de las plantas y una mezcla compleja de sustancias cuyos componentes mayoritariamente son dos grupos, derivados terpénicos (monoterpenos y sesquiterpenos) y los derivados fenilpropánicos, que se presentan en menos cantidad que los demás, presentan otro grupo de compuestos de bajo peso molecular como: ácidos comprendidos como C3 y C10, alcoholes, aldehídos, ésteres y en algunos casos cumurinas (herniarina). Además, ácidos orgánicos, láctonas, anhídridos, éteres y fenoles. (12)

Las láctona sesquiterpénicas son de escasa presencia al extraerlos hidrodestilación y algunas son antimicrobianas (frente a bacterias gram negativas) e inhibidores del crecimiento de bacterias. (14)

Destacan por su actividad antimicrobiana los derivados terpénicos oxidados representados en primer lugar por derivados fenólicos, como timol y carvacrol, los cuales modifican la permeabilidad de la membrana bacteriana ocasionando su muerte, obtenido utilizando principalmente destilación por arrastre de vapor de agua, se le reconoce las propiedades para el dolor de muelas, lesiones cariosas y cicatrización de heridas, en los que se aplica la resina, molestias de reumatismo, usando las ramas maceradas como papilla o hervidas para su aplicación local remojadas en alcohol para frotar la parte afectada.(30)

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cómo es el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle) sobre cepas de *Streptococcus mutans*?

1.3 OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo Principal

- Determinar la eficacia antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle L.* en cepas de *Streptococcus mutans*.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la sensibilidad bacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle L.* en las concentraciones de 25 %, 50 %, 75 %, 100% en cepas de *Streptococcus mutans*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Schinus molle L.* sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.4.1 Importancia de la investigación

De las infecciones más prevalentes en la cavidad bucal, la caries dental es probablemente la más prevalente. Es un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto de metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, las bacterias orales permanecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana.

En antecedentes científicos precedentes, 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 tienen propiedades antibacterianas, así lo señalan los antecedentes. Sumando que el *Schinus molle L.* es accesible económicamente y geográficamente al ser originario y abundante en el Perú.

Científicamente es importante sería un aporte importante en la odontología, teniendo alternativas naturales y tomando como inicio

este estudio para ampliar más estudios referente a las plantas naturales. A nivel mundial, se explora como una nueva alternativa el uso de los productos naturales como fuente de nuevos y diversos agentes antibacterianos, es necesario poder comprobar mediante estudios la efectividad de estas plantas de manera tratando de contribuir a la una solución a este problema social. El uso de esta planta, como agente preventivo en el control de la de la carga bacteriana frente a este tipo de bacteria que predomina en cavidad bucal.

Académicamente, 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.

Importante socialmente, al tener como fuente principal un recurso natural y de fácil obtención, el *Schinus molle* L. es accesible económicamente y geográficamente al ser originario y abundante en el Perú, siendo una excelente alternativa de bajo costo y sin presentar efectos adversos a diferencia de los agentes químicos utilizados para contrarrestar la proliferación de la caries dental y así mismo poder reducir los altos porcentajes de prevalencia de la caries dental en el Perú.

Esta investigación es importante porque pretende demostrar que el aceite esencial de *Schinus molle* L. "Molle" 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.

1.4.2 Viabilidad de la investigación

La presente investigación es viable de realizar ya que se cuenta con todos los recursos necesarios para llevarla a cabo, como:

- **Recursos humanos:**

Investigador : Bachiller Calcin Quispe Solange Gracia Paz

Asesor : Dra. Sandra Clara Alicia Corrales Medina

- **Recursos financieros**

El presente estudio será financiado en su totalidad por el investigador.

- **Recursos botánicos**

Semillas de *Schinus molle L.*, recolectadas en José Luis Bustamante y Rivero. Provincia de Arequipa, departamento de Arequipa

- **Recursos materiales**

- Guantes barbijo
- Gorros
- Cepas certificadas de *Streptococcus mutans* de Laboratorio GenLabdel PerúS.A.C. tecnologías para la vida
- Aceite esencial del *Schinus molle*
- Caldo Brain Heart Infusión (BHI)
- Agar Mitis Salivarius
- Agar Nutritivo.
- Agar Müller Hinton.
- Agar Base sangre
- Alcohol de 96°

- **Recursos de equipos**

- Balones de vidrio de 100,250,500ml
 - Embudos de vidrio
 - Fiolas de 100ml
 - Matraces de 500ml
 - Pipetas de 1,5 y 10 ml
 - Placas petri de 100 x 15 mm
 - Condensador
 - Probetas de 25 y 50 ml
 - Tubos de ensayo
 - Vasos de precipitación de 250 y 500 ml
 - Pera de decantación
 - Estufa
 - Equipos soxhlet
 - Cocina eléctrica
 - Balanza analítica
 - Equipo de destilación
 - Autoclave
 - Refrigerador
 - Incubadora
 - Microscopio
 - Cámara digital
- **Recursos institucionales**
 - Laboratorio de Biología de la Universidad Nacional San Agustín
 - Universidad Alas Peruanas.

1.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

El presente trabajo de investigación, no presentó limitaciones debidas que se contó con todo el material e instrumentos.

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Rivadeneira Cajas, Daysi; Álvarez Velasco, Patricia. **ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* L. (MOLLO) COMO POTENCIAL ANTIMICROBIANO SOBRE *Streptococcus mutans* ESTUDIO INVITROECUADOR, 2015.** El estudio tuvo como finalidad evaluar el potencial antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Schinus molle* L. (s. molle) como sustancia natural comparada con el glucanato de clorhexidina al 0.12 % sobre cepas de *Streptococcus mutans* donde se evidenció una variación en las sustancias expuestas a las 24 y 72 hora existiendo un aumento de las medidas del halo de inhibición a las 72 horas de exposición mostrando el glucanato de clorhexidina al 0.12% un incremento de 1.8 % la concentración del s. molle L. al 50 % un incremento en un 0.8 no existiendo aumento ni disminución de la medida del hidrolato del aceite. Se destacó la efectividad del aceite esencial de *S. molle* L. tanto a las concentraciones del 100 y 50 % la primera teniendo a incrementar su poder de acción frente al agente microbiano a lo largo del tiempo y segunda manteniéndose estable.⁽¹⁾

2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

Alba Gonzales, Alex; Bonilla Rivera, Pablo; **Arroyo Acevedo, Jorge ACTIVIDAD CICATRIZANTE DE UNA POMADA CON ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* L. “MOLLE” EN GANADO VACUNO CON HERIDAS INFECTADAS Y EN RATONES LIMA, 2009.** En la investigación se evaluó la actividad cicatrizante del aceite esencial del *Schinus molle* L. “molle” a diferentes concentraciones en comparación con un producto comercial, donde evidenciamos que el aceite esencial del *Schinus molle* L. “molle” constituido principalmente por monoterpenos y sesquiterpenos, en pomada y teniendo como base vaselina sólida. Los resultados mostraron que el producto posee propiedades

cicatrizantes frente a las heridas infectadas en ganado vacuno las que sanaban de manera apropiada; así mismo, los experimentos llevados a cabo en ratones de cepa Balb C 53, corroboraron la experiencia mencionada, siendo la concentración al 2% la que presentó mayor poder de cicatrización frente a la pododermatitis y mastitis subclínicas. ⁽²⁾

Moran Suclla, Joel Enrique **DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA in vitro DEL ACEITE ESENCIAL DE Schinus molle l. (molle) FRENTE A cándida albicans TACNA, 2009.**

Teniendo como resultados una susceptibilidad de cándida albicans se encontró a partir del volumen de 10ul de aceite esencial puro. La CMI fue 12,49 mg/ul y la CMM fue de 12,60 mg/ul, la cándida albicans presenta sensibilidad al aceite esencial de *Schinus molle*.es recomendable proponerlo como alternativa para nuevos estudios. ⁽³⁾

2.1.3. ANTECEDENTES LOCALES

Moncada Valerio Francisco Manuel **DETERMINACION DE LA COMPOSICION Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DEL SCHINUS MOLLE L. (MOLLE) DE AREQUIPA Y MOQUEGUA contra klebsiella pneumoniae, pseudomona-aeruginosa y staphylococcus aureus Arequipa, 2013.**Esencial de molle de Arequipa presenta un mejor efecto antimicrobiano con bacterias Gram positivas. La Concentración Bactericida Mínima (CBM) para el aceite esencial de *Schinus molle L. (molle)* de la localidad de Arequipa frente a *Staphylococcus* fue de 6 25%.⁽⁴⁾

2.2. MARCOTEÓRICO

2.2.1. Schinus molle L. (Molle)

El conocimiento y la utilización de la fitoterapia definida como el uso de los productos de origen vegetal, es más frecuente, incluso está profundamente difundida y arraigada en las distintas regiones del Perú, el *Schinus molle* L. se aplica en tratamiento de enfermedades relacionadas al *Streptococcus mutans*, además los españoles en el Perú encontraron que *Schinus molle* L. ha sido utilizado en diferentes patologías en la medicina indígena y su efecto terapéutico se debe al contenido de químicos (metabólicos primarios y secundarios) denominados principios activos de los vegetales⁽⁵⁾

Actualmente se utilizan en tratamientos suaves, no agresivos. Árbol siempre verde de altura 10-12m. de altura de ancha copa y ramaje colgante, de aspecto llorón, muy ornamental, tronco corto, grueso muy figurado con la corteza que se desprende en placas.⁽⁶⁾



Figura N° 1: Planta de *Schinus molle* L.
Fuente: foto tomada en JLB y R.

La corteza exuda resinas muy aromáticas⁽⁶⁾ hoja paripinnadas, de 250 cm de longitud dispuestas en ramillas colgantes en zig-zag, tiene de 14 a 30 folíolos de forma linear-lanceolada y borde algo dentado, sobre todo los jóvenes, muy ramificadas, largas y colgantes, con flores pequeñas de color blanco verdoso⁽⁷⁾.

Con savia lechosa; imparinnadas de 15 a 41 foliolos, generalmente apareados de 0.85 a 5cm de largo, estrechamente lanceolados, color verde amarillento ⁽⁸⁾

El árbol de molle es originario de Sudamérica (MOLLE) deriva de la voz quechua “mulli”. Este árbol fue citado por muchos naturalistas y viajeros de la época de la conquista de América. Existen referencias de árboles de molle en las zonas altas de los andes y también hay registros de molle o aguaribay en la zona de las misiones (noroeste de Argentina, sur de Brasil y norte de Uruguay). ⁽⁹⁾

Se distribuye naturalmente desde los 10°S en Perú hasta los 34s en argentina El Schinus molle L. es propio de regiones cálidas y secas de Sudamérica ,su distribución altitudinal varía de 0 a 3800 msnm, precipitaciones anuales de 300 a 200mm y temperaturas de 18 a 34c,tiene una gran capacidad de rebrote.⁽⁸⁾

Progresas en terrenos secos y rocosos gracias a sus raíces bien desarrolladas las que les puede llegar hasta 20 a 30 m de profundidad para buscar agua, requiere suelos ligeramente alcalinos con tendencia a la neutralidades exigente en la luz, ligeramente resistente a las heladas, resistentes a las terminales y a la sequía ⁽¹⁰⁾

El molle es una planta con actividad anti fúngica y antimicrobiana principalmente en las hojas ⁽¹¹⁾.

2.2.1.1. Floración y fructificación

- a) Floración:** Panículas axilares en las hojas terminales de 10 cm a 15 cm de largo, flores muy pequeñas y numerosas, de color amarillento, miden 6 mm transversalmente.⁽¹¹⁾

La especie florece de agosto a diciembre y de septiembre a noviembre en varias localidades de Brasil en Bolivia florece de octubre a noviembre y en el Perú de noviembre a abril ⁽¹⁰⁾

- b) Fructificación:** Drupas en racimos colgantes, cada fruto de 4 mm a 7 mm de diámetro, rosados o rojizos, con exocarpo coriáceo, lustroso, seco en la madurez, mesocarpio delgado y resinoso. ⁽¹¹⁾

Los frutos se producen de diciembre a febrero y de noviembre a abril en varias localidades de Brasil, en Bolivia fructifica de abril a mayo, la dispersión de las semillas es zoocórica principalmente por aves ⁽¹⁰⁾

- c) Semilla:** Se encuentra rodeada del endocarpo del fruto, forma oblonga, comprimida tiene dos cotiledones grandes, carnosos, oblongos. La radícula es corta, inferior carece de endospermo ⁽¹⁰⁾

2.2.1.2. Nombre común

Pirul,pirú,árbol del Perú (México); molle, cuyash, huaribay (Perú); aymará (Bolivia); muella falso pimiento, pimiento (Colombia); milli (Ecuador); pimentero, aroeira; amescla; aroeira_periquita, bálsamo; aguaribay terebino, árbol de la pimienta, Gualeguay (Argentina);pimentero (Chile).⁽¹⁰⁾

2.2.1.3. Clasificación botánica

Reino: plantae

Filo: magnoliophyta

Clase: magnoliopsida

Orden: sapindales

Familia: anacardiaceae

Género schinus

Especie: s. molle⁽¹⁰⁾

2.2.1.4. Composición química de la corteza, hojas y frutos del molle

La corteza del pimiento presente una importante cantidad de extraíbles químicos: taninos, oleorresinas, ácidoslinoleicos y lignocérico; además de triterpenos y glicósidos. Las hojas se utilizan para el teñido de lanas, proporcionando un tinte amarillo.⁽⁸⁾

Las semillas contienen ácido linoleico, se ha comprobado que la variación estacional afecta la concentración de los aceites en la semilla.⁽¹¹⁾

Los frutos y semillas presentan además varios aceites esenciales: mirceno, felandreno, limoneno y candinol, los que pueden extraerse fácilmente por arrastre de vapor de agua.⁽¹¹⁾

El aceite esencial obtenido de frutos es de color ámbar-amarillo y olor picante y el aceite esencial de las hojas es amarillo limpio y olor agradable, contiene terpenol, felandreno, aldehídos y cetonas, etc.⁽¹²⁾

De acuerdo a los párrafos anteriores la corteza, hojas y especialmente los frutos del molle tienen un gran potencial como materia prima industrial en la elaboración de perfumes, jabones, repelentes, domésticos, insecticidas agrícolas y elaboración de productos de medicina natural para el tratamiento de cólera, reumatismo, la tuberculosis, bronquitis y hemorragias.⁽¹²⁾

2.2.1.5. Propiedades medicinales

- Su corteza se le han atribuido propiedades tónicas antiespasmódicas cicatrizantes. Al frotarse en la piel genera una sustancia que aleja a los mosquitos.⁽⁶⁾
- Los frutos secos en infusión se toman contra la retención de orina.⁽¹³⁾
- Las hojas hervidas y los baños con el agua de las hojas en decocción, sirven como analgésico y antiinflamatorio de uso externo.⁽¹³⁾
- Los frutos frescos en infusión se toman la retención de orina ⁽¹³⁾
- El molle es una especie de amplio uso en padecimientos digestivos, como cólicos.⁽¹⁴⁾
- También sirve para el dolor de muelas, dientes picados y cicatrización de heridas. ⁽¹⁵⁾
- Se aplica en los problemas de reumatismo, usando las ramas maceradas como papilla para su aplicación local.⁽¹⁴⁾
- Cuando se presenta afecciones como tos gripe, asma, y tuberculosis se toma la infusión.⁽¹⁶⁾

2.2.2. Aceite esencial ⁽¹⁶⁾

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que puede ser alcoholes, acetonas, cetonas, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas.

Se definen, según AFNOR (1998), como:

Productos obtenidos a partir de una prima vegetal, bien por arrastre con vapor, bien por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los citrus, o bien por destilación seca. El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros modos de obtención;

puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos en su composición. Esta definición establece claramente las diferencias que existen entre los aceites esenciales oficiales (que se usa en medicina) y otras sustancias aromáticas empleadas en farmacia y perfumería conocidas vulgarmente con esencias.

Están ampliamente distribuidos en coníferas (pino, abeto), mirtáceas (eucaliptus), Frutos (anís), sumidades floridas (F. Labiatae).

Entre las principales propiedades terapéuticas debidas a la presencia de aceites esenciales, cabe destacar la antiséptica (durante muchísimos años estas especies vegetales se han empleado como especias, no solo para dar sabor sino también para conservar los alimentos); antiespasmódica; expectorante; carminativa y eupéptica; etc. Se debe tener en cuenta algunos aceites esenciales, sobre todo a dosis elevadas son tóxicos, principalmente a nivel del sistema nervio central. Otros, como el de ruda o enebro se considera que poseen propiedades abortivas.

2.2.2.1. Clasificación de los aceites esenciales ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾

Los aceites esenciales se pueden clasificar en base a diferentes criterios; consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

a) **Consistencia:** De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en:

- Esencias
- Bálsamos
- Resinas

Las esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente

Los bálsamos son extractos naturales obtenidos de un arbusto o árbol. Se caracterizan por tener un alto contenido de ácido benzoico y cinámico, así como sus correspondientes esteres.

Son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización.

b) **Origen:** De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como:

- Naturales
- Artificiales
- Sintéticos

Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.

Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes por ejemplo, la mezcla de esencias

Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicas y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.)

c) **Naturaleza química:** El contenido total en aceites esenciales de una planta es en general bajo (inferior al 1%) por mediante extracción se obtiene es una forma muy concentrada que se emplea en los diversos usos

industriales. La mayoría de ellos, son mezclas muy complejas de sustancias químicas. La proporción de estas sustancias varía de un aceite a otro, y también durante las estaciones, a lo largo del día, bajo las condiciones de cultivo y genéticamente.

2.2.2.2. Características físicas de los aceites esenciales ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾

Los aceites esenciales son volátiles y son líquidos a temperatura ambiente. Recién destilados son incoloros o ligeramente amarillos.

Su densidad es inferior a la del agua (la esencia de safrán o de clavo constituyen excepciones. Casi siempre dotados de poder rotatorio, tienen un índice de refracción elevado. Son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales como éter o cloroformo, y alcohol de alta gradación. Son liposolubles y muy poco solubles en agua, pero son arrastrables por el vapor de agua.

2.2.2.3. Características químicas de los aceites esenciales (terpenoides) ⁽¹⁷⁾ ⁽¹⁸⁾

- 1. No terpenoides:** En este grupo tenemos sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.
- 2. Terpenoides:** Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente.

Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser:

- Alcoholes (mentol, bisabolol) y fenoles(timol, carvacrol)
- Aldehídos(geranial, citral y cetonas (alcafor, thuyona)
- Esteres (acetato de bornillo, acetato de linalilo, salicilato de metilo, compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina).
- Éteres (1,8 – cineol) y peróxidos (ascaridol)
- Hidrocarburos (limoneno, a y b pineno)⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾⁽²¹⁾⁽²²⁾

Los aceites esenciales del molle han sido de diversas investigaciones muchas de ellas para determinar su composición: abundancia de compuestos terpénicos, como el limoneno, sobre todo triterpenos; pero ausencia de taninos o flavonoides.

Los aceites esenciales son llamados así por ser constituyentes odoríferos o esenciales de una planta, la palabra esencial deriva del latín quinta esencia que significa quinto elemento ^{(23) (24)}

Además, existe evidencia de su efecto citotóxico sobre células tumorales ⁽²⁵⁾

Estudios anteriores confirman la efectividad del extracto para inhibir el crecimiento de gram-positivas⁽²⁴⁾

Además, se ha encontrado propiedades neurotóxicas y antidepresivas ^{(26) (27)}

Las partes aéreas de Schinus molle presentan cierta actividad positiva contra gérmenes Grampositivos⁽²⁸⁾ también se ha evaluado al molle en su efectividad contra Staphylococcus aureus ⁽²⁹⁾

El aceite esencial del *Schinus molle* L. tiene como punto de ebullición de 150 a 300° C y está constituido por veinte o más compuestos como salicina, alcanfor y linalol ⁽³⁰⁾.

Destacan por su actividad antimicrobiana los derivados terpénicos oxidados, representados en primer lugar por derivados fenólicos, como timol y carvacrol, los cuales modifican la permeabilidad de la membrana bacteriana ocasionando su muerte los derivados alcohólicos y cetónicos, tales como linalol, geraniol, citral, alcanfor, etc., poseen igualmente propiedades antibacterianas, si bien menos marcadas que el timol y carvacrol ⁽³¹⁾

Además, tienen mayor actividad antimicrobiana conforme se mencionan son derivados alcohólicos, aldehídos y cetónicos ⁽³²⁾

Los flavonoides son de bajo molecular ⁽⁴⁷⁾; antimicrobianos (como flavonoides prenilados) ^{(43) (45)} existe una base común entre investigadores que explican sus efectos farmacológicos, estableciendo la actividad antioxidante como lo más probable ⁽³¹⁾

Los taninos vegetales son sustancias generalmente morfas de alto peso molecular que se caracterizan por formar complejos estables con las proteínas ⁽³¹⁾

Las cumarinas son de color blanco o amarillento ⁽³⁵⁾ muchas han demostrado efecto antibacterial, como el dicumarol y la acción antibiótica de la novobiocina⁽⁴¹⁾⁽⁴⁵⁾, se presentan amenudo como mezclas, en forma libre o como glicosidos ⁽³³⁾ las cumarinas libres se pueden extraer, si esta en forma de heterópsido son más o menos solubles en agua ⁽⁴³⁾⁽⁴⁵⁾

y la herniarina (7-metoxicumarina) es extraíble por hidrodestilación⁽³¹⁾

2.2.3. Extracción del aceite esencial

Para obtener la fracción cromática del material vegetal, a lo largo de los años, se usaron diferentes procesos. Motle, en su estudio consideraba los siguientes métodos:

a) Extracción por expresión

b) Extracción por solución

Con grasas sólidas y frías

Con grasas líquidas y calientes

Con solventes volátiles

c) Extracción por destilación

- Extracción por destilación con agua caliente
- Extracción por arrastre de vapor ⁽³⁶⁾

2.2.3.1 Extracción por destilación por arrastre de vapor ⁽³⁷⁾

Esta técnica resulta una de las más simples y económicas para obtener el aceite esencial de este tipo de planta y en general para cualquier otro. Las ventajas de este método son su simplicidad, bajo costo y el hecho de poder maniobrar grandes volúmenes de materia prima.

La extracción es una de las operaciones básicas del laboratorio. Se define como la acción de separar con un líquido una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más íntegro posible. Se pueden realizar desde los tres estados de la materia, y se llaman de la siguiente manera.

- 1) Extracción sólido – líquido
- 2) extracción líquido – líquido
- 3) extracción gas – líquido

La primera es la más utilizada y es sobre la que trata este escrito de la extracción con el equipo Soxhlet. Como ejemplo se pueden citar todas las obtenciones de principios activos de los tejidos vegetales. La segunda tiene usos especialmente en química analítica cuando se extrae el producto de una reacción efectuada en fase líquida con un solvente específico para separar uno o algunos de los componentes.

2.2.4. Clorhexidina

La clorhexidina es un agente antimicrobiano, pertenece al grupo de las biguanidas. Se aplica de forma tópica. Tiene una fuerte carga positiva y se libera de manera lenta. Ha sido evaluada por Lõe de forma amplia como un agente anticaries. ⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾

2.2.4.1. Propiedades de la clorhexidina

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.

2.2.4.2. Indicaciones

La clorhexidina está indicada en:

- Pacientes de higiene oral deficiente
- Pacientes con ortodoncia
- Enfermedad periodontal
- Caries, entre otras. ⁽⁴⁰⁾

2.2.4.3. Contraindicaciones

- Casos de hipersensibilidad
- Embarazo
- Lactancia
- Hiperpigmentación dentaria. ⁽³⁸⁾⁽⁴⁰⁾

2.2.4.4. Ventajas

- Amplio espectro contra bacterias, hongos y levaduras.
- Puede disminuir la caries, la placa y la gingivitis. ⁽⁴¹⁾

2.2.4.5. Desventajas

- Sabor algo desagradable (amargo)
- Irritación de mucosas
- Tinción de lengua color marrón
- Pigmentación de las piezas dentarias. ⁽⁴²⁾

2.2.5. *Streptococcus mutans*

Los *Streptococcus mutans* son *Streptococcus* orales normalmente asociados con caries dental. ⁽⁴³⁾

Adquirieron importancia en 1960 cuando se demostró que podrían ser inoculados en animales de forma experimental provocando la aparición de caries dental ^{(43) (44)}

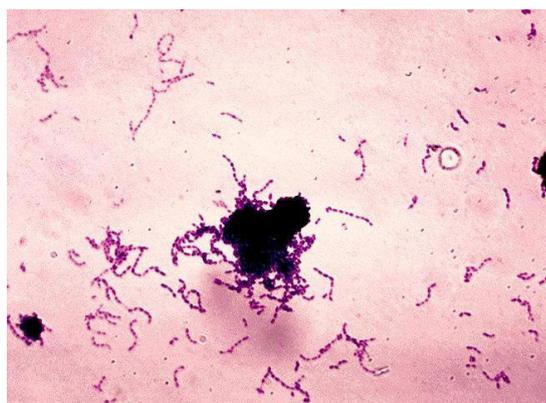


Figura N° 2 *Streptococcus mutans*
<http://www.microbiologybook.org/fox/newgram4.jpg>

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 morfo tipos 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. ⁽⁴⁶⁾

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.⁽⁴⁷⁾ 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. ⁽⁴⁸⁾

El *Streptococcus mutans* produce mayor cantidad del hidrato de carbono que otras bacterias bucales porque pueden fermentar una amplia variedad de azúcares y tolerar más ácidos que otros *Streptococcus* bucales ⁽⁴⁸⁾

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. ⁽⁴⁹⁾

Son cocos Gram positivos, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos, los cuales miden de 0.5 a 0.8 μm de diámetro, anaerobios facultativos, forman parte de la flora microbiana residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas, son patógenos oportunistas en enfermedades humanas como la caries dental y la endocarditis infecciosa, entre otras.⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾

Entre los factores de patogenicidad presentes en *Streptococcus mutans* destacan:

- Poder acidogénico, acidófilo y acidúrico
- Síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles, fructanos.
- Síntesis de polisacáridos intracelulares.
- Capacidad adhesiva por las proteínas salivales, que posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, capacidad agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosil transferasas y proteínas receptoras de glucanos.
- Producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos. La habilidad del *Streptococcus mutans* de sintetizar glucanos insolubles a partir de la sacarosa de la dieta a través de la glucosil transferasa, facilita la formación de la biopelícula dental.⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾

Se ha demostrado que el *Streptococcus mutans* está implicado en el inicio de la lesión de caries, en los últimos años se han realizado una serie de estudios, entre los que se destaca el estudio de Fitzgerald y Keyes en 1960, quienes demostraron el papel de *Streptococcus mutans* como agente microbiano cariogénico en caries experimental en humanos, en las muestras de placa dental in situ sobre lesiones de caries iniciales de mancha blanca. Además, Van Houte en 1994, señaló que *Streptococcus mutans* constituye una alta proporción de la flora cultivable antes y durante el inicio de la lesión de caries.⁽⁵⁶⁾

También, se reportaron la presencia en lesiones de caries profunda pero en menos cantidades de *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguis* y *Streptococcus constellatus*, las cuales se encuentran asociadas con lesiones de placa profunda.⁽⁵²⁾

La patogenicidad del *Streptococcus mutans* está asociada a varios factores como:

- Acidogenicidad
- Aciduridad

- Acidofilicidad
- Síntesis de glucanos y fructanos
- Síntesis de polisacáridos intracelulares
- Producción de dextranasa y fructanasa
- Presencia de glucosiltransferasas
- Proteínas de fijación celular
- Proteínas fijadoras de glucanos⁽⁵⁰⁾

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.⁽⁵⁰⁾⁽⁵⁶⁾.

Se caracteriza además por ser ácido génico, ácido filo y ácido úrico. Tiene la capacidad de modificar el pH de 7 a 4.2 alrededor de 24 horas. Es capaz de producir polisacáridos extracelulares que favorecen la adhesión del mismo a las superficies dentarias es un fermentador de glucosa, lactosa, manitol con la producción de ácidos. Usualmente no producen hemólisis en agar sangre.^{(53) (54)}

2.2.5.1. Taxonomía

El grupo de *Streptococcus mutans* pertenece al grupo *vividans*, dicho grupo es una mezcla de *Streptococcus* residentes habituales de la boca y la parte superior del tracto respiratorio a menudo producen alfa hemólisis (zona verde) y algunos de ellos no producen hemólisis. Cabe recalcar que el grupo *viridans* no está dentro de la clasificación de Lancefield.⁽⁴⁰⁾

2.2.5.2. 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 glucános adsorbidos, y en los procesos de agregación bacteriana. Posee proteínas parietales superficiales, que 26 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 glucános 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 controvertido. 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. ⁽⁵⁰⁾ ⁽⁵⁶⁾

2.2.5.3. 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. ⁽⁵⁷⁾

- **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.⁽⁵⁷⁾

La alta afinidad de *Streptococcus mutans* por la sacarosa y su alta capacidad para transportarla hacen que este microorganismo sea el que probablemente contribuya más a la acidogénesis y subsecuente formación de caries, cuando la sacarosa es un componente significativo en la dieta de la persona. El *Streptococcus mutans* puede fermentar tales azúcares y producir ácido láctico en mayor proporción, ácido acético, fórmico y etanol. Esto hace que el pH baje y se desmineralice el esmalte dental.⁽⁵⁸⁾

Es la capacidad de metabolizar rápidamente los azúcares ingeridos e la dieta, los mismos que sufren un proceso de fermentación, dando como resultado la formación de ácidos principalmente ácido láctico, además ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico.^{(59) (53)}

- **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.

Es la propiedad de producir ácidos en medios con un pH similar⁽⁶⁰⁾

El pH es un factor de estrés para las bacterias por lo cual desarrolla varios mecanismos ácidotolerantes. La aciduricidad hace referencia a la capacidad que posee el microorganismo de producir ácido en un medio con pH ácido. *Streptococcus mutans* es más acidúrico que los demás tipos de *Streptococcus*.⁽⁵⁸⁾

- **Acidofilicidad:** *S. mutans* puede resistir la acidez del medio **bombeando** protones (H⁺) fuera de la célula. El *Streptococcus mutans* tiene la habilidad de responder rápida y eficientemente a grandes cambios en su medio ambiente, razón por la cual puede resistir la acidez del medio bombeando los protones fuera de la célula. Éste es un elemento fundamental de dominancia de los *Streptococcus mutans* en la placa dental cariogénica. ⁽⁵⁸⁾
- **Síntesis de polisacáridos extracelulares :** A partir de la fermentación de hidratos de carbono, principalmente de la sacarosa, el *S. mutans* puede sintetizar polisacáridos extra celulares como glucanos (dextrans 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. Los *Streptococcus mutans* pueden sintetizar polisacáridos extracelulares solubles e insolubles como glucano, mutano y fructano por medio de las enzimas GTF y FTF. ^{(54) (41)}
- **Síntesis de polisacáridos intracelulares:** Entre éstos se encuentra el glucógeno, que sirve como reserva alimenticia y para mantener la producción de ácido durante largos períodos, aún en ausencia de consumo de azúcar. Igualmente, evita la acción tóxica del “azúcar asesino” cuando hay un aporte exógeno excesivo de sacarosa. ⁽⁵⁸⁾

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. ⁽⁵⁹⁾

- **Adhesinas:** *S. mutans* posee adhesinas de superficies para lograr la adherencia a glicoproteínas salivales y microorganismos ⁽⁵⁹⁾
- **Proteínas asociadas a la pared celular (Wap A):** Le permite adherirse a las caras libres dentarias y participar en la adherencia dependiente de la sacarosa. ⁽⁵⁹⁾
- **Bacteriocinas:** los *Streptococcus mutans* tienen la capacidad de sintetizar bacteriocinas; toxinas proteicas para inhibir el crecimiento de bacterias similares o cepas vecinas. ⁽⁴²⁾
- **Producción de dextranasa y fructanasa:** Además de movilizar reservas de energía, estas enzimas pueden regular la actividad de la glucosiltransferasa removiendo productos finales de glucano. Igualmente, permiten a los microorganismos mantener la producción de ácidos cuando no hay aporte exógeno de carbohidratos. ⁽⁴²⁾
- **Proteína de adhesión celular (PAC):** Son unas **proteínas** antigénicas que se encuentran en la cápsula o pared del *Streptococcus mutans* e inician la adhesión a la superficie dental, lo cual es inusual, debido a que éstas se encuentran presentes en otros microorganismos en apéndices como en las fimbrias. Por otro lado, pueden unirse también al colágeno en los túbulos dentinales, situación importante en el desarrollo de caries radicular. Se ha sugerido que esta molécula posee varios receptores, lo cual implica múltiples

dominios de unión, además de que interactúa con el componente secretorio, la albúmina, aglutinina salivares y glicoproteínas. ⁽⁵⁹⁾

- **Glucosiltransferasas:** Como ya se mencionó antes, las glucosiltransferasas del *Streptococcus mutans* juegan un papel importante en la cariogenicidad de esta bacteria, esto es debido a la habilidad de estos microorganismos para sintetizar glucanos adhesivos los cuales están relacionados con la acumulación y adherencia de las bacterias de la placa sobre la superficie del diente. ⁽⁴²⁾
- **Proteínas Fijadoras de Glucanos (GBPs):** Son productos extracelulares que unen o asocian glucanos en presencia de sacarosa y por esto se encuentran involucradas en los procesos de formación de placa dental bacteriana cohesiva. Teóricamente, las proteínas fijadoras de glucanos son importantes en el ámbito molecular de la patogénesis de la caries dental por *Streptococcus mutans*.⁽⁵⁹⁾

2.2.5.4. 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. ⁽⁵⁰⁾

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente.⁽²⁹⁾

Se describe la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre resultara en la presencia de una cavidad. ⁽⁶¹⁾

2.3. Definición de términos básicos

- **Cepas:** Conjunto de microorganismos derivados de las múltiples divisiones de una célula inicial.
- **Concentración:** Magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en el sistema internacional es el mol por metro cúbico (mol/m³).
- ***Streptococcus mutans*:** Es una bacteria gran positiva, anaerobia facultativa que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana formando parte la placa dental.
- **Flora microbiana bucal:** En nuestra cavidad bucal es habitada por distintas especies de microorganismos una flora microbiana dependerá de la higiene bucal, nuestro estilo de vida y nuestros hábitos alimentarios
- **Efecto antibacteriano:** El término refiere a una sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición.
- **Aceite esencial:** son compuestos formados por fracciones líquidas volátiles que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, aldehídos y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas, generalmente destilables por arrastre de vapor de agua contiene.

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 el aceite esencial del *Schinus molle* L., tenga efecto de sensibilidad in vitro sobre las cepas de *Streptococcus mutans*.

3.1.2. Hipótesis derivadas

Es probable que el aceite esencial del *Schinus molle* L., no tenga efecto de sensibilidad in vitro sobre las cepas de *Streptococcus mutans*.

3.2. VARIABLES; DEFINICIÓN CONCEPTUAL Y OPERACIONAL

Variable	Indicadores	Sub indicadores	Naturaleza	Escala de medición	Tipo de Variable
Efecto antibacteriano Aceite esencial <i>Schinus molle</i> 100%, 75%, 50%, 25%	Diámetro del halo de inhibición	mm	Cuantitativa	De razón	Independiente

CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA

4.1 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1.1 Tipo de estudio

Este proyecto es de tipo experimental, según las características de la investigación y sus objetivos planteados, porque se va manipular la variable independiente para observar su efecto, para así poder analizar los datos obtenidos.

4.1.2. Diseño de investigación

4.1.2.1. De acuerdo a su temporalidad

La presente investigación es transversal, solo se realizó una medición, a las 48 horas.

4.1.2.2. De acuerdo al lugar de recolección de datos

La presente investigación, los datos fueron recolectados en el laboratorio de Biología Celular 102B de la escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín – UNSA, al que se presentó una solicitud. (Véase ANEXO N° 1).

4.1.2.3. De acuerdo al momento de la recolección de datos

La presente investigación es prospectiva porque la recolección de datos se obtuvo desde el momento que se inició la realización la investigación.

4.1.2.4. De acuerdo a la finalidad de la investigación

La presente investigación es descriptiva porque vamos a evaluar e identificar el efecto antimicrobiano del aceite esencial del molle en las cepas del *Streptococcus mutans*.

4.2 DISEÑO MUESTRAL

Para la presente investigación se ha trabajado en 11 placas Petri, cada placa se colocó diferentes concentraciones del aceite esencial del *Schinus molle* L.

4.2.1. Criterios de inclusión:

- Cepas liofilizadas certificadas de *Streptococcus mutans*.
- Extracto de aceite esencial *Schinus molle* L..
- Medios de cultivo en buen estado.
- Condiciones de incubación adecuadas

4.2.2. Criterios de exclusión:

- Cepas no certificadas
- Cepas no adecuadas
- Medios no preparados adecuadamente
- Medios de cultivos contaminados

4.3. TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

Las técnicas que se aplicaron para medir las variables de interés fueron la observación indirecta, en el laboratorio a partir de esta técnica los datos obtenidos se registrarán en una ficha de recolección de datos. (Véase ANEXO N° 2)

4.3.1. Procesamiento del material vegetal

4.3.1.1. Obtención de la planta

La planta de *Schinus molle* L. será recolectada en el mes de julio, en el departamento de Arequipa, Provincia de Arequipa, distrito de José Luis Bustamante y Rivero, se presentó una solicitud al herbario de la Universidad Nacional de San Agustín la identificación taxonómica de la planta fue realizada por el Herbarium Arequipense (HUSA) de la Facultad de Ciencias Biológicas del Departamento

Académico de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín (UNSA), Arequipa-Perú (véase ANEXO N° 3)

4.3.1.2 Obtención del aceite esencial de *Schinus molle* L.

Se recolectó 750 g de las semillas de *Schinus molle* L. se procedió a lavar de esta forma eliminar los residuos, y también la cáscara serán empaquetados en sobres de aluminio para ser sometidas calor seco a temperatura de 210 °C en la estufa por un periodo de 15 minutos. (Véase ANEXO N° 4)

Luego se procedió a moler las semillas de *Schinus molle* L. con la ayuda de un mortero y pistilo se procedió a moler hasta la obtención de partículas uniformes luego procederemos a empaquetar 10 g en papel filtro. (Véase ANEXO N° 5)

La destilación por arrastre de vapor es una técnica utilizada para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles mezclados con ella. El arrastre en corriente de vapor hace posible la purificación de muchas sustancias de punto de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura, Es muy útil para sustancias que hierven por encima de 100° a la presión atmosférica y se descomponen en su punto de ebullición o por debajo de este.

Para la destilación por arrastre de vapor se pesaron 10 g de los frutos de *Schinus molle* L. (molle), 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° 6)

Seguidamente, se procedió a la extracción del aceite esencial en una pera se decantación, separando primero el aceite del agua. A continuación se añadió sulfato de sodio anhidro al aceite obtenido y se dejó reposar durante 30 minutos, Se llevó los extractos al equipo de destilación obteniéndose un extracto casi seco, para finalmente almacenarlo en frasco a una temperatura de -4 °C. (Véase ANEXO N° 7)

4.3.2. Preparación del material microbiológico

Las cepas certificadas serán obtenidas del laboratorio GenLab del Perú S.A.C. Tecnología para la vida, para la activación de las cepas de *Streptococcus mutans* liofilizada se mantendrá en refrigeración. (Véase ANEXO N° 8)

Se reactivarán en medio de cultivo de caldo BHI (Brain Heart Infusión), en el cual se procederá a la siembra las cepas y se colocó en la incubadora a temperatura de 37°C por 24 horas, para la reproducción, se realizara en placa Petri en agar sangre y también será llevado a la incubadora por 24 horas, luego se procederá a la identificación de las cepas de *Streptococcus mutans* con la coloración de Gram para constatar su pureza. (Véase ANEXO N° 9)

4.3.2.1. 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 Infusión), en la cual se procedió a sembrar la cepa y se incubó a 37°C por 48 horas; para su

reproducción, se replicó (en una placa de Petri) en agar base sangre y también se llevó a la incubadora por 48 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° 10)**

4.3.2.2. 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 se procederá a cubrir con solución de cristal violeta por 1 min. Luego de ello se procederá a lavar la lámina con agua de caño.
- Se cubrió la lámina con lugol durante 1 min. Y se procederá a lavar.
- Se sostuvo la lámina entre el pulgar y el índice y se bañará 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 lavará.
- Se observó al microscopio a 40x y posteriormente a 100x con aceite de inmersión, donde se evidenciarán colonias Gram-positivos agrupadas en cadenas y pares lo que nos indicará que son colonias de *Streptococcus mutans*. (Véase ANEXO N° 11)

4.3.3. Determinación de la sensibilidad antimicrobiana

Se utilizó el método de difusión con la técnica de Kirby y Bauer, utilizando discos de papel filtro de 6 mm almacenados en un sobre, que fueron esterilizados por 15 minutos a 121 °C, de diámetro, estos discos serán impregnados con las diferentes concentraciones del aceite esencial Schinus molle L., con la clorhexidina al 0.12% (como control positivo) y agua destilada (control positivo).

Se preparó agar base sangre 40 gr y se diluyó en 1000 ml de agua destilada en un matraz, se llevó a esterilizar a 121 °C por un tiempo de 15 minutos luego se le incorporó sangre al agar base sangre, la cantidad de 5ml en 100 ml.

Se mezcló uniformemente el agar base sangre con la sangre y se preparó 11 placas Petri previamente esterilizadas, se vertieron 20 ml de agar sangre en 11 placas Petri, se esperó por 24 horas para realizar la siembra.

Luego se realizó la siembra con el inóculo preparado en la suspensión de la bacteria un estudio equivalente de 10^8 UFC/ml con la ayuda de un hisopo estéril e forma horizontal de derecha a izquierda en forma vertical de arriba hacia abajo.

En cada placa Petri se colocó cinco discos impregnados con el aceite esencial en las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100%, uno con clorhexidina al 0,12% (control positivo) y otro con agua destilada (control negativo) con la ayuda de una pinza estéril, en total fueron 6 discos en cada placa Petri, se llevó a incubación a 37 °C se realizara las mediciones de los halos a las 48 horas.

Se efectuó la lectura del diámetro de los halos de inhibición alrededor del disco que contiene impregnado el aceite esencial Schinus molle L. y la clorhexidina, la lectura de los diámetros se realizó desde el exterior de la tapa y se anotó en la ficha de

recolección de datos para ello utilizamos la regla milimetrada vernier.(Véase ANEXO N° 12)

4.3.4. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Esta prueba se basó en la sensibilidad del microorganismo, se realizará diluciones seriadas del aceite esencial del *Schinus molle*. “molle” en caldo BHI, después se agregó la suspensión bacteriana estandarizada de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 para determinar a qué concentración del aceite esencial del *Schinus molle*. “molle” que inhibe el crecimiento bacteriano.

Se toma 1ml del aceite esencial del *Schinus molle*. “molle“ y se pesa teniendo como peso 109,96 mg/mL lo que nos da una concentración madre de 100%.

El inóculo contenía 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 1 ml de caldo BHI descargando todo el material bacteriano y luego se retiró el asa. Se colocó en la estufa a 37°C por 48 horas.

Para la dilución se necesitó una concentración de 10^6 UFC/mL, para ello se realizó una dilución del inóculo ya preparado (10^8 UFC/mL). Es decir, se puso en un tubo de ensayo 9 ml de caldo BHI y después se agregó 1 ml de la concentración de 10^8 UFC/ml.⁷¹

- Se colocó a cada tubo 1 ml de caldo BHI (8 tubos).
- Al tubo N°1 se añadió 1 ml del aceite del esencial *Schinus molle*. “molle” 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 procedió a mezclar.

- 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°8.
- El tubo N°9 solo contenía caldo BHI (Control Negativo).
- El tubo N°10 solo 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 48 horas a 37°C.
- Se Observó la turbidez de los tubos para hallar el punto de ruptura. (Véase ANEXO N° 13)

4.4. TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

La tabulación de datos se realizó a través de la confección de una matriz de sistematización, respecto al procesamiento de la información que se lleva a cabo de manera computacional, la representación de los datos se hizo a partir de la confección de tablas y elaboración de datos.

4.5. ASPECTOS ÉTICOS

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

CAPÍTULO V:
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO, TABLAS DE FRECUENCIA, GRÁFICOS, DIBUJOS, FOTOS, TABLAS, ETC

TABLA N°01

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial *Schinus molle L.* al 100% y el control positivo (clorhexidina) al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas

	Control positivo	“molle”
	0,12%	100%
Media =	11.42	9.55
Desviación estándar =	0.51	0.70
Límite Inferior =	10.65	8.75
Límite Superior =	12.60	11.25
Total	11	11

Fuente: Matriz de datos

Interpretación: En la tabla N° 01, se aprecia la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Schinus molle L.* en la concentración del 100 % sobre cepas de *Streptococcus mutans*, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 9.55 mm.

GRÁFICO N°01

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle* L. al 100% y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas.

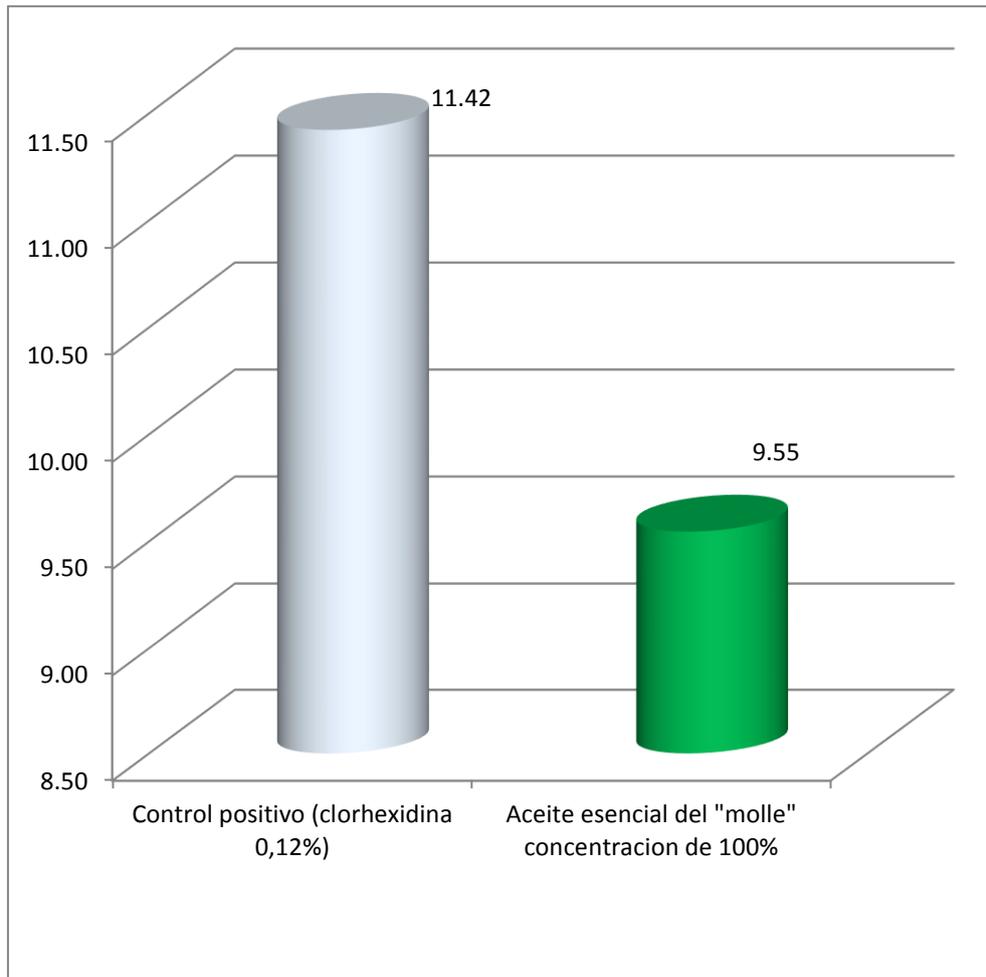


Tabla N°02

Actividad antibacteriana *in* del aceite esencial Schinus molle L al 75% y la clorhexidina al 0.12 % en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas.

	Control positivo	“molle”
	0.12%	75%
Media =	11.42	8.34
Desviación estándar =	0.51	0.74
Límite Inferior =	10.65	6.95
Limite Superior =	12.60	9.20
Total	11	11

**Fuente : matriz de
datos**

Interpretación: En tabla N° 02 se aprecia la actividad antibacteriana del aceite esencial del Schinus molle en una concentración 75% sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Respecto al control positivo, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 11.42 mm, mientras para el aceite esencial del Schinus molle, su halo formado correspondió a 8.34 mm.

GRÁFICO N°02

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle* L. al 75% y control positivo (clorhexidina al 0.12 %) en cepas de *Streptococcus mutans* las 48 horas.

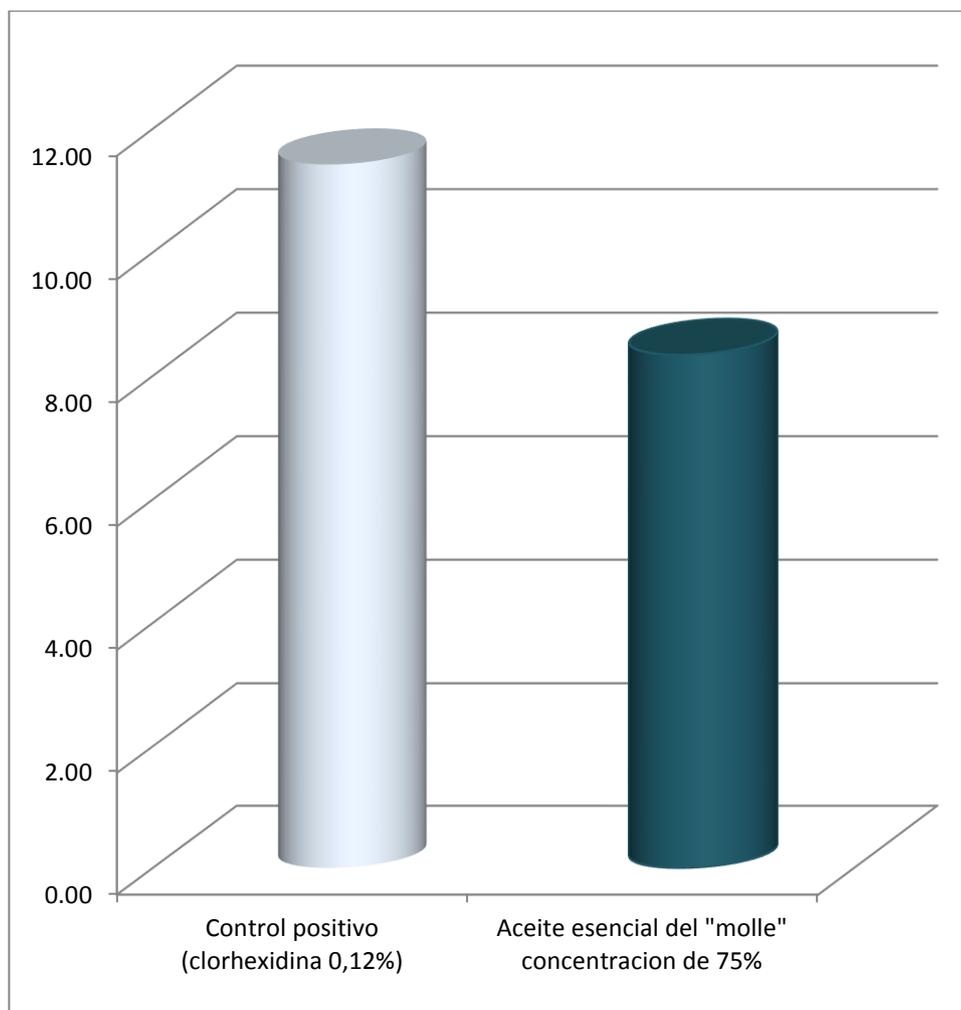


Tabla N°03

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial *Schinus molle L.* al 50% y control positivo (clorhexidina al 0.12 %) en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas.

	Control positivo	"molle"
	0.12%	50%
Media =	11.42	7.05
Desviación estándar =	0.51	0.43
Límite Inferior =	10.65	6.5
Límite Superior =	12.60	7.75
Total	11	11

Fuente: matriz de datos

INTERPRETACIÓN: En tabla N° 03 se aprecia, la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Schinus molle L.* en una concentración 75% sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto al aceite esencial del *Schinus molle L.* su halo de inhibición correspondió a 7.05 mm; el halo de inhibición del control positivo fue mayor, que el formado por el aceite esencial del *Schinus molle L.* a esta concentración.

GRÁFICO N°03

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle* L. al 50% y control positivo (clorhexidina al 0.12 %) en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas.

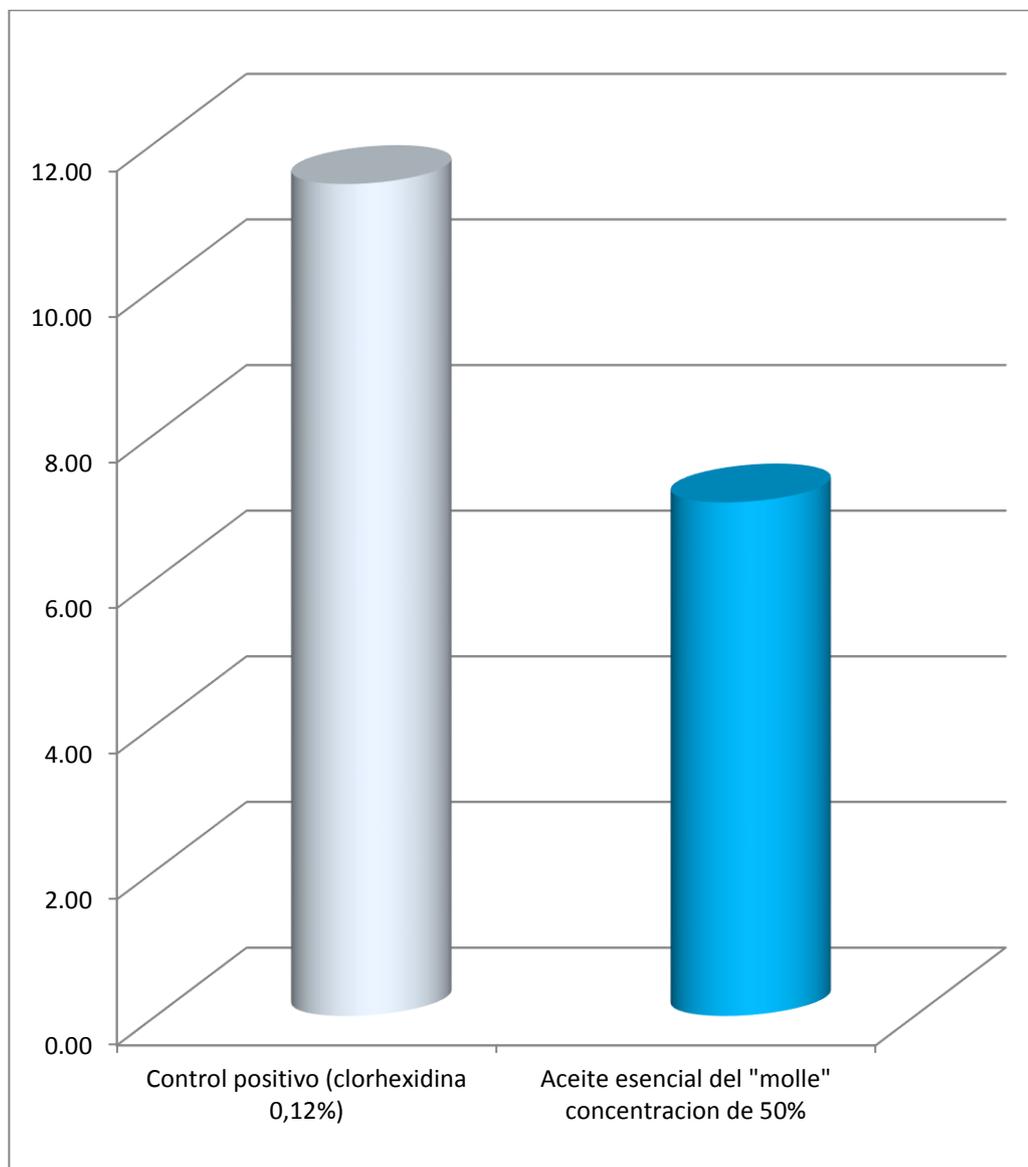


Tabla N°04

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial *Schinus molle* L. al 25% y control positivo (clorhexidina al 0.12 %) en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas.

	Control positivo	“molle”
	0.12%	25%
Media =	11.42	7
Desviación estándar =	0.51	0.34
Límite Inferior =	10.65	6.66
Limite Superior =	12.60	7.55
Total	11	11

Fuente: matriz de datos

INTERPRETACIÓN: En tabla N° 04 se observa la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Schinus molle* en una concentración 25% sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Respecto al control positivo, se puede observar que formó un halo de inhibición promedio de 11.42 mm mientras que, para el aceite esencial del *Schinus molle*, su halo formado correspondió a 7 mm; el halo de inhibición del control positivo fue mucho mayor que el formado por el aceite esencial del *Schinus molle* a esta concentración.

GRÁFICO N° 04

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle* L. al 25% y control positivo (clorhexidina al 0.12 %) en cepas de *Streptococcus mutans* las 48 horas.

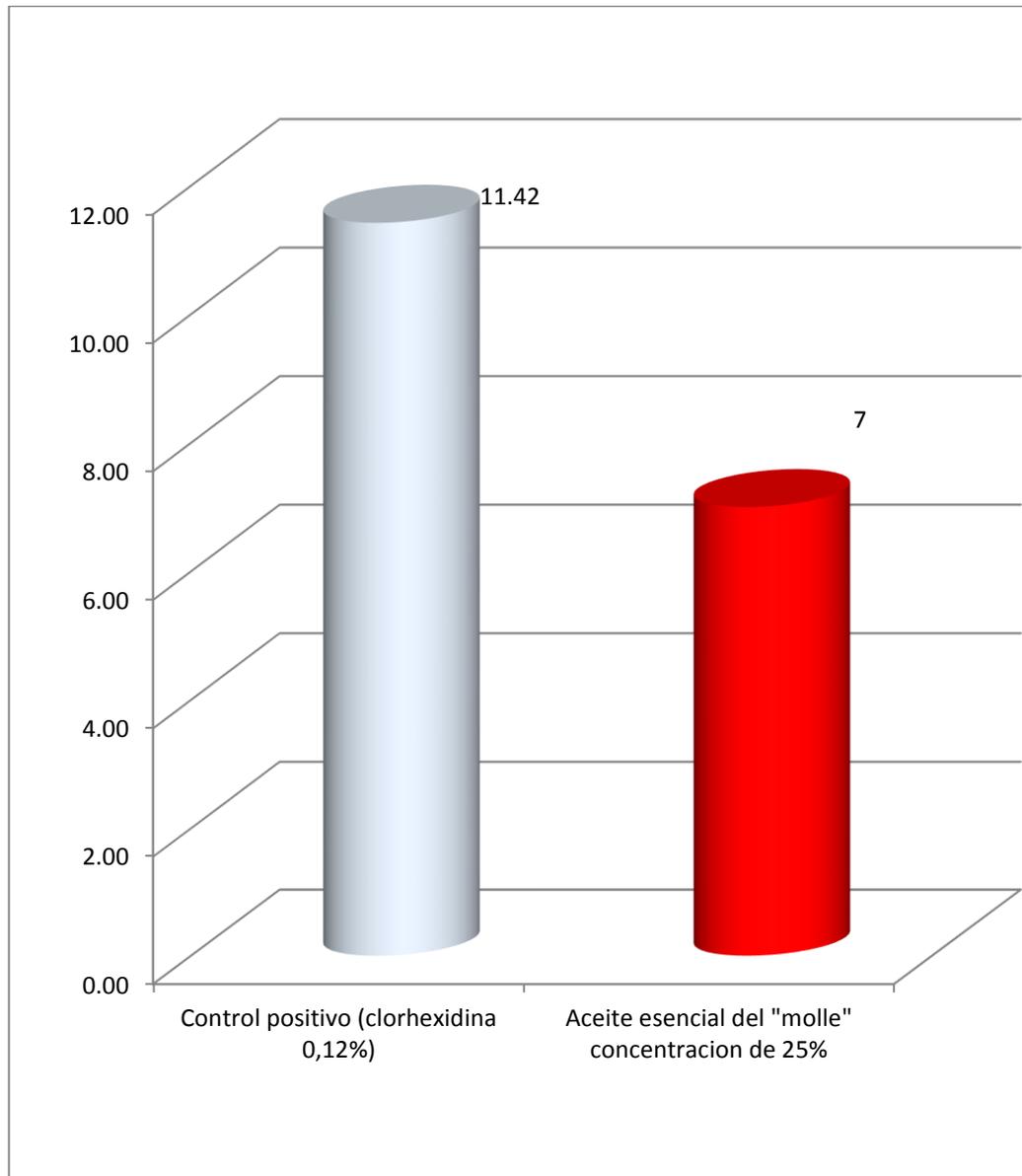


TABLA N° 05

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle L.* en las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% en cepas de *Streptococcus mutans* las 48 horas.

	Concentración 25%	Concentración 50%	concentración 75%	Concentración 100%
Media =	7mm	7.05 mm	8.34 mm	9.55 mm
Desviación estándar =	0.34 mm	0.43 mm	0.74 mm	0.70 mm
Límite Inferior =	6.66 mm	6.5 mm	6.95 mm	8.75 mm
Limite Superior =	7.55 mm	7.75 mm	9.20 mm	11.25 mm

Fuente: Matriz de datos

Interpretación: En la Tabla N° 05, se muestra la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Schinus molle L.* en las diferentes concentraciones probadas sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

Los resultados obtenidos nos permiten definir que, para una concentración de 25%, el halo inhibitorio fue en promedio de 7 mm; respecto a la concentración de 50%, el halo correspondió a 7.05 mm; la concentración de 75%, tuvo un halo de 8.34 mm; y finalmente en la concentración de 100%, el halo que se formó fue 9.55 mm. De acuerdo a estos valores, las mayores concentraciones del aceite esencial del *Schinus molle L.* tuvieron mayores halos inhibitorios.

GRÁFICO Nº 05

Actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial del *Schinus molle* L. en las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100% en cepas de *Streptococcus mutans* a las 48 horas.

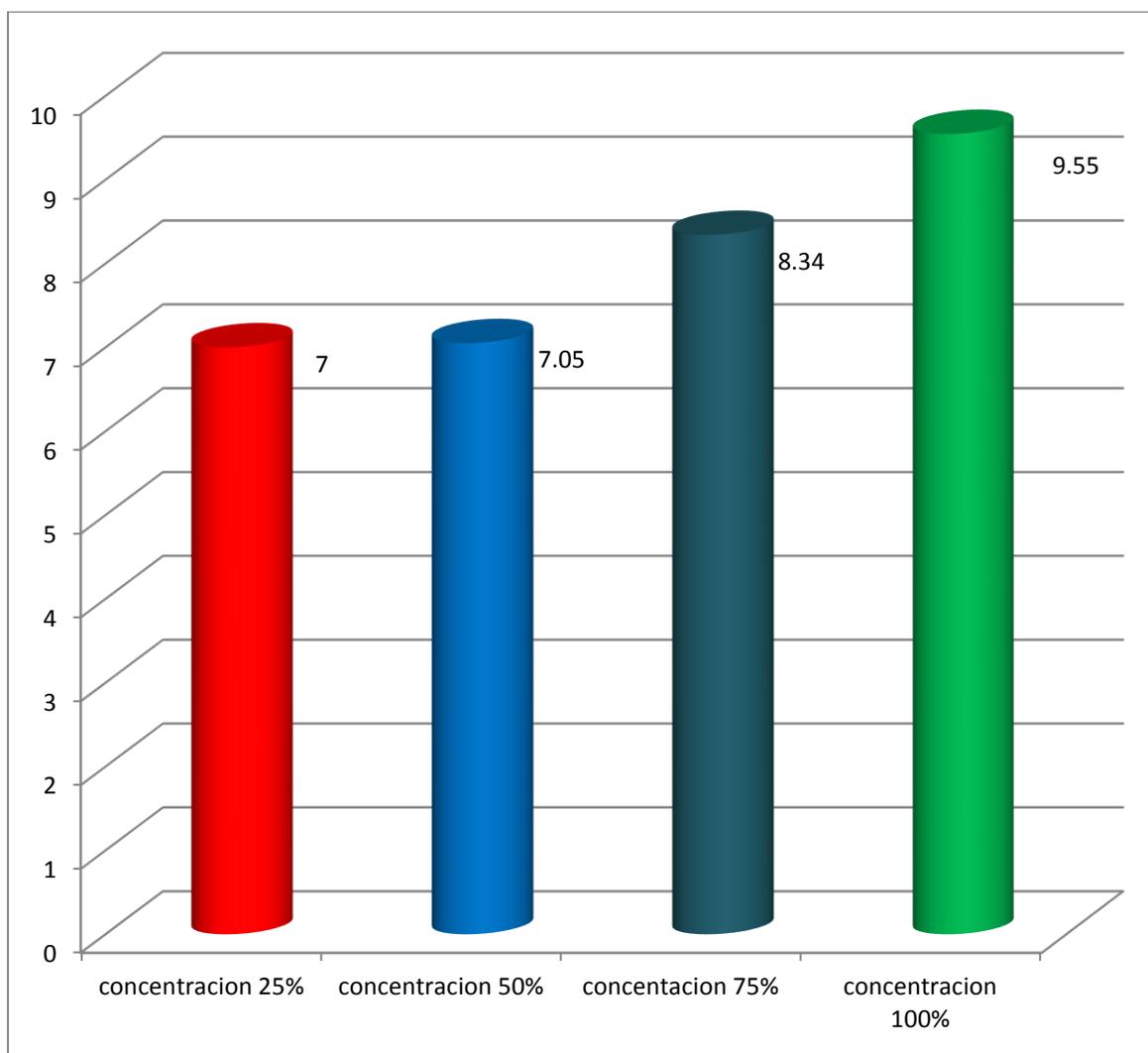


TABLA N° 06
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

	N° de Tubos								Control	
	1	2	3	4	5	6	7	8	+	-
Caldo BHI	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Extracto de Schinus molle. "Molle"	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	/	/
Inoculo 10⁶ UFC /ml	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	/
Concentración del extracto en mg/ml	109,96	54,98	27,49	13,745	6,873	3,436	1,718	0,859	/	/
Concentración del extracto en porcentaje	100%	50%	25%	12,50%	6,25%	3,13%	1,56%	0,78%	/	/
Turbidez S. mutans	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
CIM						6,873				

INTERPRETACIÓN: Para la determinación de la CMI se empleó el método de dilución en caldo BHI de las cepas de *Streptococcus mutans* y aceite esencial del *Schinus molle L.* en las concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12,50%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%. En la tabla N°05 se observa que el Aceite esencial *Schinus molle L.* frente a *Streptococcus mutans* tiene una CMI de 6,873 mg/ml la cual representa actividad antibacteriana menor concentración

5.2. ANALISIS INFERENCIAL

TABLA N° 07

Prueba de análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana *in vitro* de las concentraciones del aceite esencial *Schinus molle L.* sobre el *Streptococcus mutans*.

Schinus molle L.	Suma de cuadros	Grado	Significación P
25			
50	13.37	40	0.00
75			
100			

Interpretación: la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Schinus molle* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* en las diferentes concentraciones del aceite esencial del *Schinus molle L.* 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 aceite esencial del *Schinus molle L.*, es mayor la actividad antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

TABLA N° 07

Prueba t de Student para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial del “molle” en las diferentes sobre el *Streptococcus mutans*.

ACEITE ESENCIAL	Valor Estadístico	Grados de Libertad	Significancia P
100%	7.18	20	0.00 (P < 0.05)
75%	11.34	20	0.00 (P < 0.05)
50%	21.51	20	0.00 (P < 0.05)
25%	23.68	20	0.00 (P < 0.05)

Interpretación: En la comparación llevada a cabo de la actividad antibacteriana entre las diferentes concentraciones del aceite esencial del Schinus molle L., (Tablas N° 01, 02, 03, 04), se aplicó la prueba estadística t de Student, que compara dos medias aritméticas y nos permite establecer si la diferencia entre los grupos de estudio son o no significativa.

Como se aprecia, según la prueba estadística aplicada, la diferencia encontradas fueron significativas, por tanto podemos colegir que a mayor concentración del aceite esencial del Schinus molle L. es mayor la actividad antibacteriana sobre cepas de *Streptococcus mutans*.

5.3. COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS, TÉCNICAS ESTADÍSTICAS EMPLEADAS

5.3.1. Hipótesis principal:

Es probable que el aceite esencial del *Schinus molle* L. Tenga efecto de sensibilidad in vitro sobre las cepas de *Streptococcus mutans*

Conclusión:

De acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla N°06), procedemos a aceptar la hipótesis principal, puesto se ha demostrado que el aceite esencial de *Schinus molle* L. tuvo efecto antibacteriano, siendo mejor a concentraciones mayores.

5.3.2. Hipótesis derivadas

Es probable que el aceite esencial del *Schinus molle* no tenga efecto sobre las cepas de *Streptococcus mutans*.

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°06), procedemos a aceptar la hipótesis derivada, pues queda demostrado que el aceite esencial del *Schinus molle* L. presenta efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus mutans*

5.4. DISCUSIÓN

En la presente investigación de tipo experimental se buscó evidenciar la eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial del *Schinus molle L.*, en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175; para ello se realizó concentraciones de aceite esencial del *Schinus mole L*, obtenidos de las semillas de 25%, 50%, 75%, 100%, además se utilizó la clorhexidina a una concentración de 0.12% que nos sirvió como control positivo y también se usó el agua destilada como control negativo, sobre *Streptococcus mutans* “ATCC 25175”, para tener mayor verificación en los procedimientos.

En estudios realizados, por Cedamanos Gutiérrez Ítalo Wilfredo, quien trabajo el aceite esencial en concentraciones de 0, 25, 50, 75 y 100 % y teniendo como grupo control bencilpenicilina procainica 1000000 UI, determino teniendo como concentración mínima inhibitoria al 25 % y en el presente estudio la concentración mínima inhibitoria fue de 6, 25%.

Aún no se refieren estudios sobre la toxicidad del aceite esencial del *Schinus molle L.* , pero sí de estudios fármaco-químicos donde se demuestra que esta especie vegetal presenta denominados compuestos fenólicos que le da las propiedades antibacterianas este trabajo de investigación también ha demostrado que el extracto etanólico *Schinus molle L.* 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 100% un halo de 9.55 mm y 75% 8.34 mm a las 48 horas y el control positivo(clorhexidina al 0.12%) a las 48 horas 11.42 mm.

En el trabajo de investigación, “EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Schinus Molle* (MOLLE) SOBRES *Streptococcus Mutans* ATCC 25175”, autor: Gómez Vera Enrique Moroni sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se utilizaron diez concentraciones del extracto (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 mg/mL). Un control positivo con gluconato de clorhexidina al 0.12% los resultados indicaron que en las concentraciones 22,5 y 25 mg/ml obteniendo halos en promedio de 10.4 y 12.5 mm respectivamente y el control tuvo una medida de 14 mm, mientras que en nuestro estudio realizado se

evidencia que el control positivo presenta mayor halo de inhibición que el aceite del *Schinus molle* L.

Cabe indicar que al observar los cultivos a las 72 horas se observa el incremento del halo de inhibición para el aceite esencial del *Schinus molle* L mientras que el halo para el control positivo (clorhexidina) evidencia una disminución del diámetro; este resultado coincide con lo referido por Rivadeneira Cajas, Daysi; que al comprobar el potencial antimicrobiano del aceite esencial del *Schinus molle* L, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 determinó que a concentraciones del 100% y 50% el efecto antimicrobiano se volvió estable a lo largo del tiempo lo que sugiere que el efecto a largo plazo del aceite esencial del molle es evidente.

Con lo referido anteriormente se pretende evidenciar que la acción antimicrobiana del *Schinus molle* L, es relevante además de determinar este efecto se mantiene estable a mayor tiempo lo que resulta beneficioso para lograr una actividad antibacteriana de mayor eficacia.

CONCLUSIONES

- PRIMERA** : En cuanto a la eficacia antibacteriana del aceite esencial *Schinus molle L.* sobre cepas de *Streptococcus mutans* se determinó que las concentraciones de 100% y 75% tuvieron mayor efecto, al evaluar los halos inhibitorios, reflejando una media de 9.55 mm y 8.34 mm respectivamente.
- SEGUNDOA** : Para la prueba de sensibilidad, por medición de halos inhibitorios se determinó que el aceite esencial de *Schinus molle L.* a la concentración de 25% evidenció una media aritmética de 7 mm, al 50% fue de 7.05 mm, al 75% la media fue de 8.34% y finalmente a la concentración de 100% se comprobó una media aritmética de 9.55mm.
- TERCERA:** La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) in vitro del aceite esencial del *Schinus molle L.* sobre las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 fue de 6.87 mg/ml.

RECOMENDACIONES

- PRIMERA** : Se recomienda a los estudiantes de Estomatología realizar estudios experimentales con el aceite esencial del *Schinus molle* L. frente a otros patógenos de la cavidad bucal, para ampliar el espectro de actividad antimicrobiana de esta.
- SEGUNDA** : Se sugiere a los profesionales realizar pruebas *in vivo* utilizando el aceite esencial de *Schinus molle* L. en diferentes presentaciones como colutorios, pastas dentales y otros para comprobar la efectividad de los componentes activos del aceite esencial *Schinus molle* L.
- TERCERA** : Se recomienda a los estudiantes y egresados de La Facultad 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.
- CUARTA** : 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 del aceite esencial del *Schinus molle* L. para el tratamiento antibacteriano de *Streptococcus mutans*.
- QUINTA** : Se recomienda a los estudiantes y egresados de la Facultad de Estomatología, realizar pruebas “in vivo” en cavidad oral con productos naturales para el control de la concentración del *Streptococcus mutans*.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Rivadenaria Cajas Daysi; Alvarez Velasco Patricia, Aceite Esencial de Schinus molle L. (MOLLE) Como potencial antimicrobiano sobre Streptococcus mutans, estudio in vitro Ecuador, 2015.
2. Alba Gonzales Alex, Bonilla Rivera Pablo; Arroyo Acevedo, Jorge: Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle L.* "MOLLE" EN GANADO VACUNO CON HERIDAS INFECTADAS Y EN RATONES LIMA, 2009.
3. Moran Suclla, Joel Enrique: DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA in vitro DEL ACEITE ESENCIAL DE Schinus molle L. (molle) FRENTE A candida albicans TACNA, 2009.
4. Moncada Valerio Francisco Manuel DETERMINACION DE LA COMPOSICION Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DEL Schinus molle L. (MOLLE) DE AREQUIPA Y MOQUEGUA CONTRA klebsiellap neumoniae, pseudomona aeruginosa y staphylococcu saureus. Arequipa 2013.
5. Salazar, R. (2001). Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina
6. Fontquer P. plantas medicinales editorial labor S.A. 1ª Edición 2003
7. Instituto de fisioterapia americano segundo congreso internacional de fisioterapia y plantas medicinales .del 06 al 09 agosto lima Perú 2003.37.
8. Morales, H. (2009). En lines: Plantas Medicinales: Schinus molle Linneo -[Fecha de consulta: 14 de enero de 2013]. Disponible en: <http://aceitesencialdemolle.blogspot.com/>
9. Viturro, C.B. (9 de agosto de 2011). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la fibra aromática latinoamericana. Problemática Schinus en Latinoamérica. Proyecto CYTED IV.20.
10. Salazar, R. (2001). Manejo de semillas de 75 especies forestales de América Latina
11. Gundiza M. La actividad de Antimicrobial de aceite esencial de Schinus molle linneo. Revistamédica Africian. 1993.39 (11): 231-234. Brasil.

12. González P., D. J.; "Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales", Universidad de La Salle, Bogotá, 1984, Capítulo VI.3 J. NAT. PROD. 59 (1) 77-79 (1996).
13. Ojeda E. & Mesa R. 2008. Schinus molle L. gobierno de canarias España, 6pp
14. Cueva S. Plantas Medicinales. Editorial A.F: A., Lima. 1ª Edición 2003
15. Gupta M. y esposito M. plantas Medicinales Iberoamericanas. Editorial Cyted. 1995. 106.
16. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural ediciones omega.2003.
17. Zahed, N., Hosni, K, & Ben, N. (2011). Essential oil Composition of Schinus molle L. fruits: an Ornamental Species Used as Condiment. Journal of Food Biochemistry, 35(2) 400-408.
18. Rossini, C., Menéndez, P., Dellacassa, E., & Moyna, P. (1996). Essential Oils from Leaves of Schinus molle and S. lentiscifolius of Uruguayan Origin. J. Essent. Oil Res., 8, 71-73.
19. Bruneto, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicina. 2ª Ed Zaragoza Acribia S.A.
20. Las plantas de Extractos. Bases para un Plan de Desarrollo del Sector. Fundación Alfonso Martín Escudero. Madrid, 1999
21. Pengelly, A. (1996). The constituents of Medicinal Plants. 2nd Ed. Publishing, U. K.
22. Van Ginkel, A. (2003). Apuntes del Master y Diplomatura de posgrado de la UAB "Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y producción."
23. Choquehuanca GL. Tesis Efecto Antibacteriana in vitro del Aceite Esencial de Satureja Boliviana muña frente a Bacterias Patógenas Gram Positivas y Gramnegativas, Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias Escuela Profesional y Académica de Biología. 2004

24. Deveci, O., Sukan, A., Tuzun, N., & Hames, K. E. (2010). Chemical Composition, Repellent and Antimicrobial Activity of *Schinus molle* L. . . *Journal of Medicinal Plants Research* 2211-2216.
25. Diaz, C., Quesada, S., Brenes, O., Aguilar, G., & Cicció, J. (2008). Chemical Composition of *Schinus Molle* Essential oil and its Cytotoxic Activity on tumor cell lines.- *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, 1521-1534
26. Machado; D. G., Bettio, I., E., Cunha, M. P., Santos, A. R., Pizzolatti, M., & Brighente, I. M. (2008). Antidepressant-like Effect of Rutin Isolated from the Ethanolic Extract from *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the Involvement of the Serotonergic and Noradrenergic Systems. *European Journal of pharmacology*, 163-168
27. Machado ; D. G., Kaster, M., P., Binfare, R. W., Dias M. Santos, A. R., Pizzolatti, (2007) Antidepressant-like Effect of the Extract from Leaves of *Schinus molle* L. in mice: Evidence for the Involvement of the Monoaminergic system. *Progress in Neuro- Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 421-428.
28. Amani, S. (1999). Antimicrobial Activities in some Argentine Medicinal Plants. *Acta Hort*
29. Cruz-Carrillo, A. R. (2010). Evaluación in vitro del Efecto Antibacteriano del Extracto de *Bides Pilosa*, *Lantana Cámera*, *Schinus Molle* y *Silybum marianum*. *Rev. U.D. C.A. Act. & Div. Cient.*, 117-124.
30. Villar M., Villavicencio O. *Manual de fitoterapia*. Lima (Perú): EsSalud, Organización Panamericana de la Salud; 2001
31. Villar del Fresno A. *Farmacognosia General*. España (Madrid): Síntesis, S.A., 1999.
32. Maguna F, Romero A., Garro O., Okulik N., Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Argentina: universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas; 2006 [citado 08 Julio 2012]. Disponible en : URL: <http://www.unne.edu.ar/Web/cy/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>
33. Lock de Ugaz O. *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. 2 Ed Lima (Perú): Fondo Editorial PUCP; 1994.

34. Domingo D, López-Brea M. Revisión: Plantas con acción antimicrobiana. REv.Esp.Quimioterapia 2003 Dic [citado 17 junio 2012]; 16(4): 385-393. Disponible en: URL: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>
35. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Barcelona (España): Omegas. A.; 2000.
36. Motle P. Proyecto de factibilidad para la instalación de una planta de extracción de aceite esencial de Menta. Tesis de bachiller. Lima: UNI; 1977.
37. Extracciones con Soxhlet. Carlos Eduardo Núñez.cenunez.com.ar. 2008
38. Barrancos, J., & Barrancos, P. (2006). *Operatoria Dental, Integración Clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
39. Pomacóndor, C (2010). Papel de la clorhexidina en la odontología restauradora. *Odontol Sanmarquia* 13(2), 46-49 recuperado de http://Sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2010_n/pdf/a11v13n2.pdf
40. Laprade, N., Hernández, R., Arias, M., & Valverde. A. (2014). Eficacia del gluconato de clorhexidina. *Odontología Vital*, (20), 19-26.
41. Marsh, P. (2011). *Microbiología oral*. Caracas: Amolca. pp 2, 108
42. García, J. (2015). *Patología y terapéutica dental*. España: Elsevier. pp:82-84
43. Kayser, F., Bienz, K., Eckert, J., & ZinKernagel, R. (2005). *Medical Microbiology*. New York: Trieme. Recuperado de Samaranayake, L. (2002). *Essential Microbiology for Dentrist*. China. Recuperado de: WWW.m5zn.com/newuploads/2012/12/20pdf/53b34341b599774.pdf
44. Chandra, S. (2009). *Textbook of Microbiology & Immunology*. Chennai: Elsevier. Recuperado de <https://books.google.es/books?id=HcgGLfxDJSQC> HYPERLINK
45. 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.
46. Emanuelsson I.R., Thornqvist E. Genotypes of Mutans Streptococci tend to Persist in their host for Several Years. *Caries Res*, 2000. 34(2): p. 1339.

47. Koneman E., Wim W., Allen S., Janda W., Procop G., Scheckenberger p., et. al. Diagnostico Microbiológico: Texto y Atlas en color 6ª ed. Madrid: Med Panamericana; 2006
48. 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.
49. Liébana J. Microbiología Oral. McGraw-Hill (eds), 1995. Cap. 15, pp. 220-239
50. Seki M., Yamahita Y., Torigoe H., Tsuda H., Maeno M. "Effect of Mixed Mutans Streptococci Colonization on Caries Developmet." Oral Microbiol Immunol 2006; 21:47-52.
51. Figueroa Gordon M, Alonso Guillermina, Microorganismos presentes en las diversas etapas de la progresión de caries dental. Acta odontológica venezolana- volumen 47 N°1/2009.
52. Ojeda, J., Oviedo, E., & Salas, L. (2013). Streptococcus mutans and dental caries. *Ces Odontología*, 26(1), 44-56.
53. Sarmiento, L. (2010). *Efecto antibacteriano del extracto alcohólico y del extracto acuoso de té verde (Camelliasinesis) sobre bacterias orales de Importancia Estomatológica, Streptococcus mutans, Streptococcus mitis y Streptococcus salivarius*. Arequipa: Universidad Alas Peruanas
54. Paniker, J. (2005). *Ananthanarayan and Paniker's Textbook of Microbiology*. Hyderabad: ArtiKapil. Recuperado de Nakano K., Ooshima T. (2009). Serotype Classification of Streptococcus Mutans and its Detection Outside the Oral Cavity. *Future Microbiology* 2009; 4(7), 891-902.
55. 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.
56. <http://www.encolombia.com/odontologia/investigaciones/caries.htm> fecha de acceso 15-11-13
57. Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica Fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: Panamericana. Pp 226

58. Hernández, M. (2011). *Aislamiento y Cuantificación de Streptococcus Mutans en saliva en niños de la Escuela Primaria "Ignacio Ramírez"*. Veracruz: Universidad Veracruzana. Recuperado de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30913/1/HdzMtz.pdf>
59. Juan Carlos Ojeda- Garcés, Eliana Oviedo – García, Luis Andrés Salas, Revista CES Odontología ISSN0120-971X, volumen 26 No. 1 Primer Semestre de 2013, Streptococcus Mutans and Dental Caries
60. Russ Ro, Speranza MS. Los flavonoides en la terapia cardiovascular. Rev. CostarricCardiol 2006 Ene [citado 04 de julio 2012]; 8(1): 13-18. Disponible en: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-41422006000100003&Ing=es
61. Juan Carlos Ojeda- Garcés, Eliana Oviedo – García, Luis Andrés Salas, Revista CES Odontología ISSN0120-971X, volumen 26 No. 1 Primer Semestre de 2013, Streptococcus Mutans and Dental Caries

ANEXOS

ANEXO N° 1
SOLICITUD DE USO DE LABORATORIO

SOLICITO DETERMINACION DE ESPECIE VEGETAL

Sr.

Blgo. Leoncio Mariño Herrera

Director del Herbarium Arequipense HUSA

Yo. SOLANGE CALCIN QUISPE con
DNI
46864635, egresada de la Escuela
profesional y
Académica de Estomatología de la
Universidad
Alas peruanas, Filial Arequipa. Ante
Ud. me presento y expongo:

Que siendo necesario validar la especie vegetal con la que vengo
trabajando en mi proyecto de Tesis titulado: Efecto antibacteriano del
Aceite esencial del "Molle" *Schinus molle* L. sobre Cepas de *Streptococcus*
mutans solicito la identificación taxonómica y constancia de certificación
de dicha especie, para lo cual adjunto material vegetal obtenido de la
localidad de José Luis Bustamante y Rivero de la campiña de Arequipa.

Atentamente



Solange Calcín Quispe

DNI 46864635

Recibido
24-08-2019


ANEXO N° 2

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS CONCENTRACIÓN % Y MEDICIÓN DE HALOS MM

A LAS 48 HORAS

Antibiograma	concentraciones del aceite esencial <i>Schinus molle L.</i>				Clorhexidina	Agua destilada
	25%	50%	75%	100%		
Streptococcus mutans					0.12%	-
Placa # 01						
Placa # 02						
Placa # 03						
Placa # 04						
Placa # 05						
Placa # 06						
Placa # 07						
Placa # 08						
Placa # 09						
Placa # 10						
Placa # 11						

ANEXO N° 3

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



CONSTANCIA 024- 2018-HUSA

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

HACE CONSTAR:

Que las muestras frescas de raíces, tallos, hojas y flores de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Schinus molle* L. de la familia Anacardiaceae de nombre común "molle". Dichas muestras fueron obtenidas de la localidad de Jose Luis Bustamante y Rivero. Provincia de Arequipa. Departamento Arequipa. Para la ejecución de la Tesis: Efecto antimicrobiano del aceite esencial de l "Molle" *Schinus molle* L. sobre las cepas de *Streptococcus mutans* estudio in vitro, Arequipa, 2028, ejecutado por SOLANGE CALCIN QUISPE 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: SAPINDALES
FAMILIA: ANACARDIACEAE
GENERO: *Schinus* L.
ESPECIE: *Schinus molle* L

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

Arequipa 24 de Agosto del 2018


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR

Herbarium Arequipense (HUSA)



ANEXO N° 4

RECOLECCIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Schinus molle* L.

Recolección de la planta *Schinus molle* L. en horas de la tarde en las campiña en distrito de José Luis Bustamante y Rivero, Región Arequipa.

La planta vegetal fue trasladada a los laboratorios de la Universidad Nacional de San Agustín y se procedió al Lavado, secado de las semillas de la planta vegetal.



Las semillas del *Schinus molle* L. se colocó en papel aluminio y fue sometida a 80 °C en una estufa por un periodo de 15 min. Una vez terminado el proceso de deshidratación del material vegetal se procedió a su pulverización con la ayuda de un mortero y pistilo hasta la obtención de partículas uniformes y a empaquetarlos en cartuchos de papel filtro de 10 g de peso.



ANEXO N° 5

PULVERIZACIÓN DELAS SEMILLAS *DE Schinus molle L.*

Se procedió a su pulverización con la ayuda de un mortero y pistilo hasta la obtención de partículas uniformes y a empaquetarlos en cartuchos de papel filtro de 10 g de peso.



ANEXO Nº 6

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Schinus molle* L. POR EL MÉTODO DESOXHLET

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°7

PROCESO DE DESTILACIÓN

Se eliminó todo el etanol a sequedad total para la obtención del aceite esencial del *Schinus molle L.*



ANEXO N°8
CEPAS CERTIFICADAS



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 (Al. 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 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° 0028435

Fecha	Comprobante de Pago N°
02/07/2018	F001000502

Sr(es): UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS S.A.

AV. SAN FELIPE NRO. 1109
JESUS MARIA LIMA LIMA

Punto de Llegada: AV. SAN FELIPE NRO. 1109

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

R.U.C.: 20303063766

Cod. Cliente: 95 Ped N°: 01966

Orden de Compra:

Numero de Pedido: 029145

Tipo de Movimiento:

Fecha de Traslado: 02/07/2018

Unidad de Transporte y Conductor

Marca y Placa :

N° Licencia de Conducir :

Empresa de Transporte

Sr(es):

R.U.C.:

MOTIVO DEL TRASLADO

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

COD.	CANT.	UNIT.	DESCRIPCION
H05666-A	1		Streptococcus mutans derived from ATCC® 25175™ LOTE: 266-24-B / Vendimiento: 30/06/2019

BIENES TRANSPORTADOS : Una vez recepcionada la mercadería no habrá lugar a devoluciones.

A.C. JESUS
02-07-18
p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.
Despachador

Firma y Sello

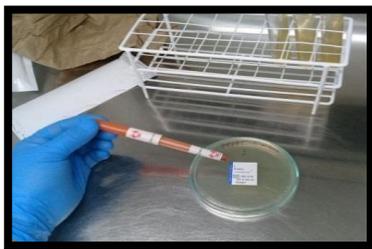
[Firma]
p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.
Almacén

RECIBI CONFORME
DESTINATARIO

PEPEGRAF, S.A. R.U.C. 20372514290 SERIE 0002 DEL 27951 al 28950 SUNAT N° 0450954021 F.I.: 03-05-2018

ANEXO N°9
ACTIVACION DE LAS CEPAS DE *Streptococcus mutans*
LIOFILIZADAS

Preparación de los medios de cultivo BHI y Agar base sangre, para la activación de las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se esterilizaron los medios de cultivos preparados y de los materiales a usar.



ANEXOS N° 10

ESCALA DE Mc FARLAND

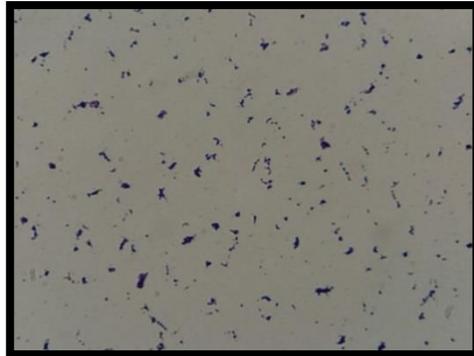
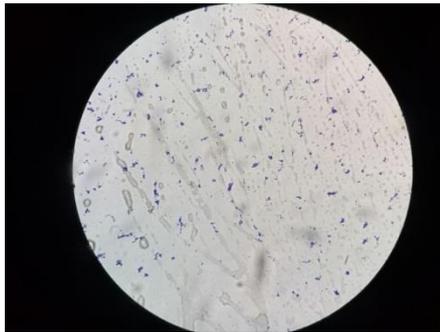
La escala de Mc farland lo empleamos como referencia en la suspensión de las bacterias para poder saber el número de bacterias por minilitro,



ANEXO N°11

COLORACION DE GRAM

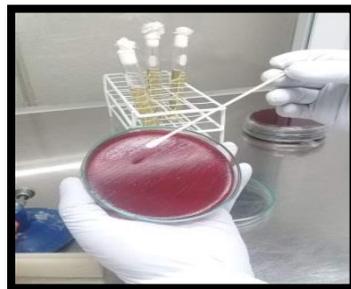
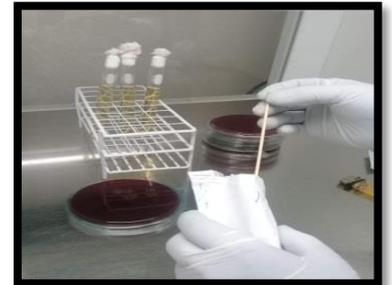
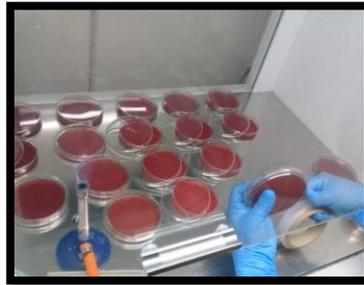
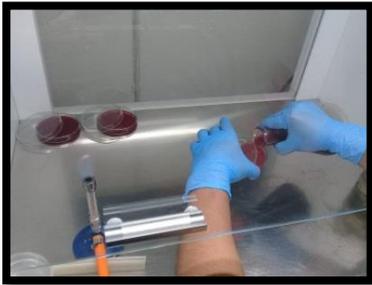
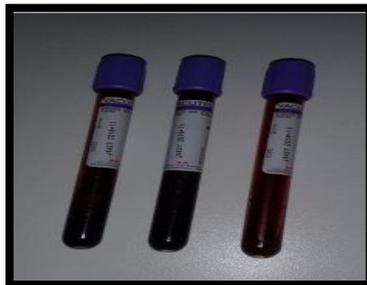
Se colocó una azada de *S. mutans* sobre una lámina limpia de portaobjetos y se preparó todo para la tinción Gram. Se realizó la coloración Gram: solución de cristal violeta (1 min.), lugol (1min.), acetona (10 seg.) y safranina (1 min.).



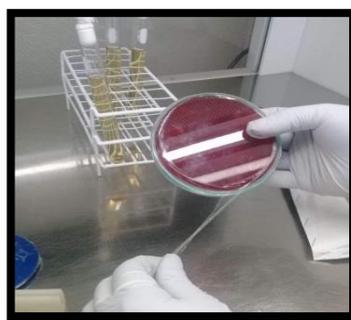
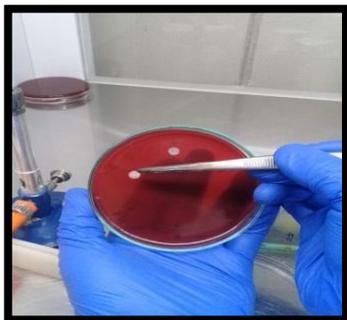
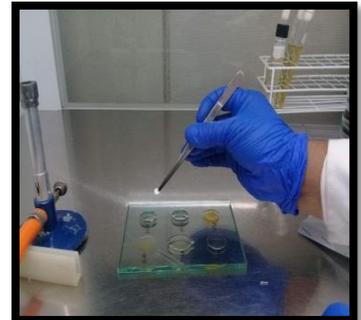
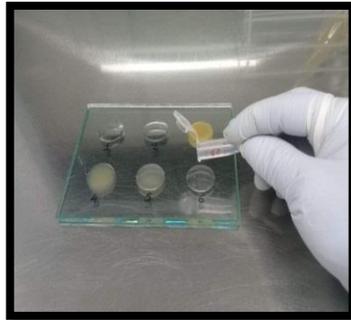
ANEXO N°12

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se sembró en 11 placas de Petri contenidas con agar sangre, y se colocaron los discos con el aceite esencial del Schinus molle en las concentraciones de “25%, 50%, 75%, 100%, la clorhexidina al 0.12% como control positivo y agua destilada como control negativo y se expusieron a la incubadora por 24 horas y se tomó las medidas de halos



La clorhexidina al 0.12% como control positivo y agua destilada como control negativo y se expusieron a la incubadora por 24 horas y se tomó las medidas de halos



Luego se procedió medir los halos a las 48 horas



Matriz de consistencia de datos: Concentraciones (%) y halos de inhibición (mm)

Placa / Tratamiento	48 HORAS					
	Control -	Control +	100%	75%	50%	25%
Placa 1	0	10,65 mm	8,75 mm	9,05 mm	7,1 mm	7,55 mm
Placa 2	0	11,5 mm	11,25 mm	9 mm	7,5 mm	7,3 mm
Placa 3	0	11,55 mm	9,3 mm	8,5 mm	7,75 mm	7,1 mm
Placa 4	0	11,5 mm	8,95 mm	8 mm	6,5 mm	7,2 mm
Placa 5	0	11,05 mm	9,8 mm	7,4 mm	7,4 mm	7 mm
Placa 6	0	10,95 mm	8,9 mm	6,95 mm	7,4 mm	6,95 mm
Placa 7	0	11,45 mm	9,45 mm	8,1 mm	6,5 mm	7,4 mm
Placa 8	0	11,25 mm	10,1 mm	7,85 mm	6,5 mm	6,6 mm
Placa 9	0	11,25 mm	9,75 mm	8,9 mm	6,9 mm	6,6 mm
Placa 10	0	12,6 mm	9,35 mm	9,2 mm	6,95 mm	6,6 mm
Placa 11	0	11,9 mm	9,4 mm	8,8 mm	7,05 mm	6,7 mm

ANEXO N° 13

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)



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 aceite esencial del *Schinus molle L.* frente a *Streptococcus mutans* tiene una CMI 6.87 mg/ml la cual representa actividad antibacteriana a menor concentración

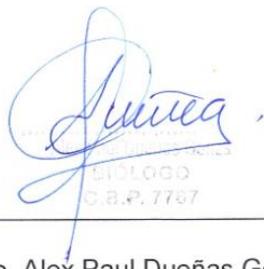
ANEXO N° 14

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACION

CONSTANCIA DE EJECUCION DE PROYECTO DE INVESTIGACION

Se otorga la presente constancia a la alumna SOLANGE GRACIA PAZ CALCIN QUISPE, identificado con DNI N 46864635 de la Universidad Alas Peruanas de la Escuela Profesional de ESTOMATOLOGIA Código 2011228652, por haber realizado y culminado satisfactoriamente la parte experimental en el laboratorio 102 B de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa con el conocimiento de su Asesora Sandra Corrales Medina del Proyecto denominado "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Schinus molle* SOBRE CEPAS DE *Streptococcus mutans* IN VITRO AREQUIPA -2018".

Arequipa 14 de septiembre del 2018



Blgo. Alex Paul Dueñas Gonza

42477967

ANEXO N°15
SOLICITUD DE USO DE LABORATORIO

Solicito: Permiso uso de Laboratorio 102B para poder "Desarrollar la parte Experimental de mi Tesis de investigación"

Señor:

Mg. CESAR AUGUSTO RANILLA FALCON

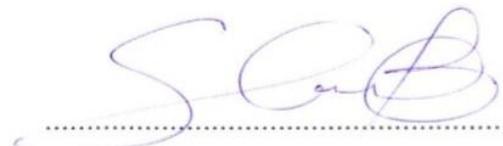
Encargado del Laboratorio de Biología Celular 102B de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Agustín - UNSA.

Presente.-

Yo, Solange Gracia Paz, es grato dirigirme a Ud. Para saludarlo y a la vez mencionarle que en mi calidad de tesista, me veo en la necesidad de **solicitar** uso de este ambiente del Laboratorio 102B esto con la finalidad que se me permita cumplir con uno de mis objetivos de la tesis de investigación que voy realizando para poder cultivar y realizar pruebas de toxicidad con la bacteria *Streptococcus mutans*.

Por lo expuesto, agradeceré a usted acceder a lo solicitado.

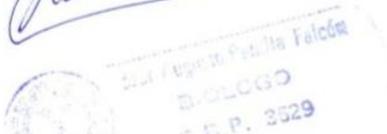
Arequipa 06 de julio de 2018



Solange Gracia Paz Calcín Quispe

DNI: 46864635

*Recibido
Ranilla*



ANEXO N°16



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

Arequipa, 06 de julio del 2018

Licenciado

César Augusto Ranilla Falcón

Encargado Laboratorio de Biología

Universidad Nacional de San Agustín

Presente.-

ASUNTO: Solicito ingreso con fines investigativos

De mi mayor consideración:

Reciba usted el cordial saludo de las autoridades de la Universidad Alas Peruanas y en especial de la Escuela Profesional de Estomatología.

Por medio de la presente hago de su conocimiento que la Srta. **SOLANGE GRACIA PAZ CALCIN QUISPE**, identificada con el DNI 46864635 egresada y para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista, se ha acogido a la modalidad de Tesis, por lo que, habiendo sido aprobado su Proyecto de Investigación titulado: **EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL Schinus molle SOBRE LAS CEPAS DE Streptococos mutans ESTUDIO IN VITRO. AREQUIPA, 2018**. Por este motivo es que, solicito a su digno despacho permitirle el ingreso a las instalaciones de la Institución que dignamente representa, para la recolección de datos y muestras por un período de 15 días, a partir del 12 de julio del 2018.

Agradeciendo anticipadamente la atención que le brinde a la presente, es propicia la ocasión para manifestarle sentimientos de mi más alta consideración.

Atentamente,

MG. HUBER SANTOS SALINAS PINTO