



UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



TEMA

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE: FOENICULUM VULGARE (HINOJO), CIMBOPOGON CITRUS (HIERBA LUISA), ORIGANUM VULGARE (OREGANO), CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE (LIMON) Y CITRUS SINESIS (NARANJA), FRENTE A CEPAS ESTANDARIZADAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS, CUSCO 2016.

TESIS PARA OPTAR EL TITULO
PROFESIONAL DE CIRUJANAS
DENTISTAS, PRESENTADO POR:

Bach. Baca Zans Liseth Karina

Bach. Yábar Fluker Adriana

ASESOR(A): C.D. MARÍA SOLEDAD MENDOZA ANTEZANA

CUSCO-2016



JURADO:

Mg. CD. Martin Tipian Tasayco
Mg. CD. Aida Valer Contreras

DICTAMINANTES: Dr.CD. Juan Carlos Valencia Martínez
CD. José Antonio Alanya Ricalde



AGRADECIMIENTOS

A nuestro Señor Dios por permitirnos finalizar esta etapa en nuestras vidas y realizar este estudio de Investigación.

A nuestra Asesora, Dra. María Soledad Mendoza Antezana, docente de la Escuela Profesional de Estomatología, por su tiempo, su apoyo incondicional, conocimientos, sin los cuales no se hubiese realizado el presente trabajo de investigación.

A los docentes dictaminantes de Escuela Profesional de Estomatología, Dr. CD. José Antonio Alanya Ricalde y Dr. CD. Juan Carlos Valencia Martínez que tuvieron el tiempo de realizar las correcciones correspondientes que contribuyeron al desarrollo de nuestro trabajo de investigación.

Al Ing. Mario Cumpa Cayuri docente la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad San Antonio Abad del Cusco, por su apoyo y orientación la parte procedimientos químicos.

A la Blga. María del Carmen Yáñez Mujica del Laboratorio Clínico Servisalud, por brindarnos sus conocimientos y facilitarnos un ambiente para realizar nuestro trabajo de investigación.



DEDICATORIA

A Dios, por darme la sabiduría y fuerza para culminar esta etapa académica.

A mis padres: Rosa y Mario por su apoyo, su amor, sus consejos, por ser modelos de inspiración para poder realizar este presente trabajo de investigación.

A mi hermana Massiel, por brindarme su apoyo incondicional y aliento en cada momento de mi vida.

A mi mamá Pilar por ser siempre un apoyo y estar pendiente de mi vida.

Al Comandante Luis Huasasquiche por demostrarnos cada día la importancia del estudio de la investigación y ser un modelo de inspiración.

A mi mejor amiga Adriana por estar en cada momento de mi vida y por haber compartido este tiempo juntas con muchas experiencias, y apoyarme incondicionalmente para el desarrollo de nuestra presente investigación.

Liseth Karina Baca Zans



DEDICATORIA

A Dios, por darme la sabiduría y fuerza para culminar esta etapa académica.

A mis padres: Skiff y Ricardo por su apoyo, su amor, sus consejos, por ser modelos de inspiración para poder realizar este presente trabajo de investigación.

A mis hermanos Diego y Jaqueline, por brindarme su apoyo incondicional y aliento en cada momento de mi vida.

A mi sobrino Joaquín por ser mi inspiración de seguir adelante cada día.

A mi madre Evita por ser siempre un apoyo y estar pendiente de mi vida.

A mi tío Herzen por darme su apoyo incondicional.

Al Comandante Luis Huasasquiche por demostrarnos cada día la importancia del estudio de la investigación y ser un modelo de inspiración.

A mi mejor amiga Karina por estar en cada momento de mi vida y por haber compartido este tiempo juntas con muchas experiencias, y apoyarme incondicionalmente para el desarrollo de nuestra presente investigación.

Adriana Yábar Fluker



ÍNDICE

RESUMEN

ABSTRACT

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.4. OBJETIVOS	4
1.4.1. Objetivo general.....	4
1.4.2. Objetivos específicos.....	5
1.5. JUSTIFICACIÓN	5
1.6. LIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
1.7. ASPECTOS ÉTICOS	6

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN	
2.1.1. Antecedentes Internacionales.....	7
2.1.2. Antecedentes Nacionales	9
2.2. BASES TEÓRICAS	12



2.2.1. PLANTAS MEDICINALES.....	12
2.2.1.1. Principios activos de las plantas medicinales	12
2.2.2. ACEITES ESENCIALES	12
2.2.2.1. Clasificación.....	13
2.2.2.2. Localización de los aceites esenciales en las plantas	13
2.2.2.3. Composición y función.....	13
2.2.2.4. Actividad antibacterial de los aceites esenciales	14
2.2.2.5. Mecanismo de acción de los aceites esenciales	15
2.2.2.6. Propiedades físicas de los aceites esenciales	15
2.2.2.7. Aplicaciones	16
2.2.2.8. Métodos de extracción de los aceites esenciales.....	16
2.2.2.8.1. Destilación por arrastre de vapor.....	16
2.2.2.8.2. Extracción con disolventes	17
2.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES UTILIZADAS	17
2.2.3.1. <i>Cymbopogon Citratus</i> (Hierba Luisa)	17
2.2.3.1.1. Origen.....	17
2.2.3.1.2. Clasificación taxonómica	17
2.2.3.1.3. Botánica.....	18
2.2.3.1.4. Composición.....	18
2.2.3.2. <i>Foeniculum Vulgare</i> (Hinojo)	19
2.2.3.2.1. Origen.....	19



2.2.3.2.2. Clasificación taxonómica	19
2.2.3.2.3. Botánica.....	19
2.2.3.2.4. Composición	19
2.2.3.4. Origanum Vulgare (Orégano)	20
2.2.3.4.1. Origen.....	20
2.2.3.4.2. Clasificación Taxonómica	20
2.2.3.4.3. Botánica.....	21
2.2.3.4.4. Composición.....	21
2.2.3.5. Cítricos	22
2.2.3.5.1. Origen y distribución	22
2.2.3.5.2. Clasificación taxonómica	22
2.2.3.5.3. Composición de Citrus aurantifolia swingle (Limón)	23
2.2.3.5.4. Composición de Citrus sinensis (naranja)	23
2.2.4. PLACA BACTERIANA DENTAL.....	24
2.2.4.1. MICROBIOLOGÍA BUCAL	25
2.2.4.2. GENERO STREPTOCOCOS	25
2.2.4.2.1. Grupo viridans	26
2.2.4.2.1.1. Streptococcus Mutans	26
2.2.4.2.1.2. Adquisición del Streptococcus Mutans	26
2.2.4.2.1.3. Medios de Cultivo para Streptococcus Mutans ..	27
2.2.5. CARIES	27
2.2.5.1. Definición de caries.....	27



2.2.5.2. Etiología de caries 28

 2.2.5.2.1. Factores primarios 28

 2.2.5.2.2. Teoría Químico parasitaria..... 29

2.2.5.3. PELÍCULA ADQUIRIDA..... 29

2.2.6. GLUCONATO DE CLORHEXIDINA 30

 2.2.6.1. Definición y antecedentes de la clorhexidina..... 30

 2.2.6.2. Mecanismo de acción 30

 2.2.6.3. Aplicaciones clínicas 30

2.3. MARCO CONCEPTUAL..... 31

2.4. HIPÓTESIS 32

2.5. VARIABLES E INDICADORES 33

 2.5.1. Variable dependiente 33

 2.5.2. Variable independiente..... 33

 2.5.3. Variable interviniente 33

 2.5.4. Variable control 33

2.6. OPERABILIZACIÓN DE VARIABLES..... 33

CAPITULO III

DISEÑO METODOLÓGICO 36

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN 36

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN 36

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA..... 36

3.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN 37



3.5. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	37
3.5.1. Técnica de recolección de muestra	37
3.5.2. Instrumento	37
3.6. TÉCNICA DE PROCESAMIENTO DE DATOS	37
3.6.1 Procedimientos Químicos	37
3.6.2. Procedimientos Microbiológicos	39
3.6.2.1. Obtención y preparación de la cepa bacteriana.....	39
3.6.2.2. Activación de cepas.....	39
3.6.2.3. Medio de cultivo.....	39
3.6.2.4. Determinación de sensibilidad antibacteriana por el método de disco-difusión	41
3.6.2.5. Medición de diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano.....	42
3.6.2.6. Evaluación de la efectividad antibacteriana.....	42
3.7. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	42
3.8. PROCEDIMIENTOS ADMINISTRATIVOS	42
3.9. RECURSOS Y MATERIALES	43
3.10. RECURSOS FINANCIEROS.....	45
3.11. RECURSOS FÍSICOS.....	45
CAPITULO IV	
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	46
4.1. Presentación de los resultados en tablas y/o gráficos.....	46
4.2. Análisis y comentarios de tablas y gráficos de los resultados.	46



CAPITULO V

DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES	62
BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	68



RELACIÓN DE CUADROS

CUADRO N° 1: Composición y función de los aceites esenciales 14

CUADRO N° 2: Composición de *Cymbopogon Citratus* (Hierba Luisa) 18

CUADRO N° 3: Composición del *Foeniculum Vulgare* (Hinojo). 20

CUADRO N° 4: Composición de *Origanum Vulgare* (Orégano). 21

CUADRO N° 5: Composición de *Citrus Aurantifolia Swingle* (Limón) 23

CUADRO N° 6: Composición de *Citrus Sinesis* (Naranja). 24



RELACIÓN DE TABLAS

TABLA N° 1: Estudio de ANOVA de POST HOC	46
TABLA N° 2: Efectividad antibacteriana de los aceites esenciales de hinojo, hierba luisa, orégano, limón y naranja, con el del gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas estandarizadas de Streptococcus Mutans.	47
TABLA N° 3: Halo de inhibición del aceite esencial de Hinojo.	48
TABLA N° 4: Halo de inhibición del aceite esencial de Hierba luisa.....	49
TABLA N° 5: Halo de inhibición del aceite esencial de Orégano.	50
TABLA N° 6: Halo de inhibición del aceite esencial de Limón.....	51
TABLA N° 7: Halo de inhibición del aceite esencial de Naranja.....	52
TABLA N° 8: Comparación de los halos de inhibición de los aceites esenciales de: Hinojo, Hierba luisa, Orégano, Limón y Naranja con el gluconato de clorhexidina al 0.12% a las 24, 48 y 72 horas.	53



ABREVIATURAS

pH: Potencial hidrogeno, concentración de iones en disoluciones.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ATCC: American Type Culture Collection.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

TSB: Tryptic Soy Broth (caldo de soja tripsinizada).

TSA: Agar Tripticasa de Soya.

INS: Instituto Nacional de Salud.

AE: Aceites esenciales.

DNA: Acido Desoxirribonucleico.

MSA: Mitis Salivarius Agar.

MSB: Mitis Salivarius Bacitracina.

BHI: Brain Heart Infusion.

PA: Película Adquirida.

NCCLS: Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.

PADS: Fina almohadilla de papel Absorbente.

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences o Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales.

ANOVA: Análisis Of Variance o Análisis de Varianza.



R: Resistente.

SL: Sensible Límite.

SM: Sensible Medio.

SS: Súper Sensible.



RESUMEN

El objetivo de este estudio in vitro fue determinar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia* Swingle (Limón) y *Citrus sinensis* (Naranja), con el del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas estandarizadas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175. Los aceites esenciales de dichas plantas se obtuvieron por el método de destilación por arrastre a vapor de agua. Para realizar el estudio microbiológico se utilizó los cinco aceites esenciales mencionados a una concentración del 100 %; como medios de cultivos se emplearon Agar Müller Hinton enriquecido con 5% de sangre humana. Estos aceites fueron comparados con un patrón control que fue el Gluconato de Clorhexidina al 0.12%. Para cada tipo de aceite esencial se realizó tres repeticiones en placas de Agar Müller Hinton con el método Kirby Bauer o método de difusión de discos donde se incorporó 10 μ l de cada aceite esencial y del patrón control sobre las cepas de *Streptococcus Mutans*. Para determinar la efectividad antibacteriana se midió el diámetro de los halos de inhibición a las 24 horas. Los diámetros de halos de inhibición para el aceite esencial de *Cimbopogon Citrus* (Hierba Luisa) fue de 32.967 mm al 100 %, en el caso de aceite esencial de *Origanum Vulgare* (Orégano) fue un halo de inhibición 15.889 mm al 100 %, para el aceite esencial de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo) fue un halo de inhibición de 15 mm al 100 %, en el aceite esencial de *Citrus Sinensis* (Naranja) fue un halo de inhibición de 14.667 mm al 100 %, Mientras que para el aceite de *Citrus aurantifolia* Swingle (Limón) tuvo un halo de inhibición de 9.333 mm al 100 %. Al realizar el estudio de ANOVA de POST HOC se demostró que existe diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición, y en la prueba de HSD de TUKEY se identificó que aceite esencial fue el más efectivo. Se concluye que los aceites esenciales de *Cimbopogon Citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Foeniculum Vulgare* (Hinojo) y *Citrus Sinensis* (Naranja) presentan mayor efecto antibacteriano sobre las cepas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175, mientras que el aceite esencial *Citrus aurantifolia* Swingle (Limón) no presenta efecto antibacteriano.



Palabras claves: Aceite esencial, Foeniculum Vulgare (Hinojo), Cimbopogon citrus (Hierba Luisa), Origanum Vulgare (Orégano), Citrus aurantifolia swingle (Limón) Citrus sinesis (Naranja), Gluconato de clorhexidina, efecto antibacteriano, Streptococcus Mutans.



ABSTRACT

The objective of this in vitro study was to determine the antibacterial effect of essential oils: *Foeniculum vulgare* (Fennel), *Cymbopogon citratus* (lemon verbena), *Origanum vulgare* (Oregano), *Citrus aurantifolia* Swingle (Limón) and *sinensis Citrus* (Orange) with chlorhexidine gluconate 0.12% on strains of *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 standardized. The essential oils of said plants were obtained by the method of steam stripping water. The five essential oils mentioned were used at a concentration of 100% for microbiological study; in Mueller Hinton agar were used enriched with 5% human blood. These oils were compared with a control pattern that was Chlorhexidine Gluconate 0.12%. For each type of essential oil, three replications were performed on plates of agar Müller Hinton with Kirby Bauer method or disk diffusion method with 10 µl of each essential oil and standard control strains of *Streptococcus mutans* were incorporated. For antibacterial effectiveness, the diameter of inhibition halos at 24 hours was measured. The diameters of inhibition halos for the essential oil of *Cymbopogon Citrus* (Lemon Verbena) at 100%, was 32.967 mm; in the case of essential oil of *Origanum vulgare* (Oregano) at 100% was a halo of inhibition 15.889 mm, for the essential oil *Foeniculum Vulgare* (Fennel) at 100% was an inhibition of 15 mm, in the essential oil of *Citrus Sinesis* (Orange) at 100%, was an inhibition of 14.667 mm while for the oil *Citrus aurantifolia* Swingle (Lemon) at 100% had a halo of inhibition of 9.333 mm. In conducting the study POST HOC ANOVA showed that there are significant differences in the diameters of the inhibition halos, and HSD test of TUKEY was identified that essential oil was the most effective. It is concluded that the essential oils *Cymbopogon Citrus* (Lemon Verbena), *Origanum vulgare* (Oregano), *Foeniculum vulgare* (fennel) and *Citrus Sinensis* (Orange) have greater antibacterial effect on strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, while the *Citrus* essential oil *aurantifolia* Swingle (Lemon) has no antibacterial effect.



Keywords: Essential oil, *Foeniculum vulgare* (Fennel), *Cymbopogon citratus* (lemon verbena), *Origanum vulgare* (Oregano), *Citrus aurantifolia* Swingle (Lemon) *Citrus sinensis* (orange), chlorhexidine gluconate, antibacterial effect, *Streptococcus Mutans*.



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La cavidad oral es un ambiente ampliamente colonizado por bacterias, que en condiciones normales son propias de dicho hábitat que viven en constante mutualismo, no produciendo enfermedad. Sin embargo cuando este equilibrio se rompe se generan enfermedades producto de bacterias oportunistas o simplemente del predominio de una de ellas (Matute, 2009) (1)

La caries es considerada así una enfermedad de etiología multifactorial, por lo que debe existir una interacción entre microorganismos, huésped un sustrato y tiempo dado; esta se manifiesta con la desintegración y desmineralización de los tejidos calcificados, dado por la acción de microorganismos, como el *Streptococcus Mutans*, que gracias a la enzima glucosiltransferasa produce ácido láctico a partir de la sacarosa y glucano (Henostroza, 2007). (2)

De modo que se han realizado varios estudios sobre la actividad antibacteriana de especies vegetales con resultados positivos; como el de plantas y frutas, por esta razón el presente estudio se realizó in vitro, para evaluar el efecto antimicrobiano de aceites esenciales de plantas medicinales y frutas. (3)

La medicina natural, a partir de las plantas y sus propiedades antimicrobianas, últimamente recibió mucha atención de los científicos, comprobándose las propiedades de sus componentes que permiten combatir a los agentes patógenos. Además, porque es importante conocer más sobre plantas medicinales, como método alternativo en el consultorio dental, pues



con ayuda, no se deberán utilizar fármacos que a largo plazo se pueden volver perjudiciales para el organismo. (Cosco 2010) (3)

En relación a sustancias antibacterianas se refirió que el Gluconato de Clorhexidina ingresa en el citoplasma e interfiere en la función de la membrana, además inhibe la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular. (Torres, 2009). (4)

Por lo tanto el objetivo del estudio es evaluar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus Aurantifolia* Swingle (Limón) y *Citrus Sinesis* (Naranja), y el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% sobre cepas ionofilizadas de *Streptococcus Mutans*, principal causante de la caries dental.



1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, la medicina natural es una de las alternativas más utilizadas y nuestro país posee una gran biodiversidad de flora; desde la antigüedad se ha utilizado estas plantas medicinales para la curación de dolencias generales del organismo incluso de origen dental. (5)

La caries se considera como una enfermedad bucal de más prevalencia en el ser humano, siendo su mayor causa la interacción entre microorganismos, huésped y el sustrato. Entre los microorganismos que incluyen la patogénesis de la caries dental tenemos a los *Streptococcus del grupo Mutans*, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*, de los cuales el *Streptococcus Mutans* es el agente más importante asociado a la caries. (6)

El *Streptococcus Mutans* es un patógeno que produce ácido láctico, propionico, ácido acético y ácido fórmico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en aproximadamente 24 horas, este microorganismo cuando metaboliza carbohidratos hace que el esmalte se disuelva rápidamente generando calcio y fosfato provocando un proceso que se llama desmineralización, estas bacterias son aproximadamente 10^{10} dentro de las 500 a 700 especies que cohabitan en la cavidad oral, localizándose con mayor predilección sobre las superficies dentales y aparatos protéticos. (7)

Datos de la OMS, revelan que el 80% de la población mundial utiliza la medicina popular (principalmente a través del uso de plantas medicinales). Existen estudios donde se ha demostrado que los efectos farmacológicos proporcionados por los fitoterapéuticos provienen de uno o más de los principios activos de los aceites esenciales. (8)

Por consiguiente los aceites esenciales son sustancias volátiles, extraídos por métodos físico-químicos de las plantas en su mayoría por la destilación; estas están formadas por sustancias químicas aromáticas teniendo como compuesto predominante a los *fenoles* los cuales han demostrado tener un



efecto antibacteriano provocando la inhibición en la producción de la glucosiltransferasa que es una enzima que se encuentra en la pared celular de las bacterias. (9)

1.2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Se ha demostrado que existen estudios sobre patógenos en la microbiología bucal que en mayor colonización provocan enfermedades en la cavidad bucal como la caries, placa bacteriana siendo el *Streptococcus Mutans* el patógeno más incidente.

Los estudios realizados sobre la efectividad antibacteriana de plantas naturales, demuestran que siendo su mayor concentración en compuestos fenólicos existe mayor inhibición de crecimiento antibacteriano sobre Gram (+) y Gram (-). Pero existen pocos estudios sobre el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia* swingle (Limón) y *Citrus sinesis* (Naranja), sobre el crecimiento del *Streptococcus Mutans*, para lo cual realizamos este trabajo de Investigación.

1.3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál será el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *citrus aurantifolia* swingle (Limón) y *Citrus Sinesis* (Naranja) sobre cepas Estandarizadas de *Streptococcus Mutans* aplicado in vitro?

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia* swingle (Limón) y *Citrus sinesis* (Naranja), sobre cepas estandarizadas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175.



1.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Medir el halo inhibitorio del crecimiento bacteriano in vitro de la cepa de Streptococcus Mutans con el aceite esencial de Foeniculum Vulgare (Hinojo) al 100%
2. Medir el halo inhibitorio del crecimiento bacteriano in vitro de la cepa de Streptococcus Mutans con el aceite esencial de Origanum Vulgare (Orégano) al 100%
3. Medir el halo inhibitorio del crecimiento bacteriano in vitro de la cepa de Streptococcus Mutans con el aceite esencial de Cimbopogon Citrus (Hierba Luisa) al 100%
4. Medir el halo inhibitorio del crecimiento bacteriano in vitro de la cepa de Streptococcus Mutans con el aceite esencial de Citrus Aurantifolia Swingle (Limón) al 100%
5. Medir el halo inhibitorio del crecimiento bacteriano in vitro de la cepa de Streptococcus Mutans con el aceite esencial de Citrus Sinesis (Naranja) al 100%
6. Comparar el halo inhibitorio del crecimiento bacteriano de la cepa de Streptococcus Mutans con los aceites esenciales de: Foeniculum Vulgare (Hinojo), Cimbopogon citrus (Hierba Luisa), Origanum Vulgare (Orégano), Citrus Aurantifolia Swingle (Limón) y Citrus Sinesis (Naranja) con el gluconato de clorhexidina al 0.12% a las 24, 48 y 72 horas.

1.5. JUSTIFICACIÓN

a. TRASCENDENCIA

Dentro de la práctica odontológica es un aporte para los estudiantes de esta escuela profesional; donde se propone opciones en el uso y la selección de sustancias antibacterianas que provengan de fuentes naturales como los aceites esenciales de Foeniculum Vulgare (Hinojo), Cimbopogon citrus (Hierba Luisa), Origanum Vulgare (Orégano),



Citrus Aurantifolia Swingle (Limón) y Citrus Sinesis (Naranja) que tiene menores efectos adversos frente a las sustancias de origen artificial.

b. RELEVANCIA CIENTÍFICA

El presente estudio de investigación ampliara los conocimientos sobre las propiedades antibacterianas de las plantas medicinales, siendo de posterior uso alternativo para enfermedades de la cavidad oral.

c. RELEVANCIA SOCIAL

La presente investigación tiene como finalidad demostrar que existen productos alternativos como el uso masivo de aceites esenciales de plantas medicinales, que puedan estar al alcance de los pacientes susceptibles a caries, disminuyendo efectos tóxicos de sustancias artificiales en el organismo.

1.6. LIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

- Dificultad en la obtención de los cultivos de cepas puras de Streptococcus Mutans.
- Elevado costo en los procesos de laboratorio Microbiológico y Químico-Farmacéutico.
- Poca información sobre el estudio de algunas plantas medicinales.
- Escasas referencias bibliográficas sobre estudios realizados en plantas naturales sobre cepas de Streptococcus Mutans.

1.7. ASPECTOS ÉTICOS

La investigación se realizó en un estudio IN VITRO, el cual no presentó ningún riesgo, respetando las normas de bioseguridad establecidas por los laboratorios de Química y Microbiología donde se observó el comportamiento del Streptococcus Mutans frente a las sustancias antibacterianas.



CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. ANTECEDENTES INTERNACIONALES

GUERRA M, RODRÍGUEZ M, GARCÍA G, LLERENA C, La Habana, Cuba (2004) En este estudio se tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*. Como metodología se empleó aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (No. Herbario 4593), obtenido mediante destilación de las hojas por arrastre con vapor de agua y caracterizado según las normas establecidas por el Comité Estatal de Normalización de la República de Cuba, se reactivó las cepas de microorganismos controles integrada por 8 bacterias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 7001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10033, *Serratia* sp, y *Salmonella typhimurium*, empleándose el método de diluciones, luego se incubaron a 37 y 28 °C respectivamente y se determinó la concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI) después de 24 horas. En los resultados se mostró que las bacterias Gram (+) son más susceptibles demostrándose que *Cymbopogon* ejercen una gran influencia en la actividad antibacteriana. (10)

PICÓN E, RODRIGO M, MARTÍNEZ A, PINA M, España, Junio (2013). El objetivo del presente estudio, fue evaluar las propiedades antimicrobianas de tres subproductos cítricos; mandarina, naranja y limón, frente a dos patógenos de especial interés para la industria agroalimentaria *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7, en medio de referencia, bajo diferentes condiciones de incubación: temperatura 5 a 22 °C y concentración de subproducto 0.5 a 10 %. Como método los subproductos cítricos fueron



proporcionados en polvo por una empresa externa productora de zumos, y proceden de la piel del limón, la mandarina y la naranja. El sustrato de referencia fue inoculado con los patógenos en estudio hasta una concentración final de 108 ufc/mL, éstos se adicionaron al sustrato en concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10 % obteniendo curvas de evolución de carga microbiana (ufc/mL) con el tiempo de almacenamiento y bajo diferentes temperaturas de incubación: 5, 10 y 22 °C. El recuento de viables se realizó siguiendo el procedimiento de diluciones seriadas y recuento en placa, y siempre utilizando alícuotas tomadas a intervalos regulares de tiempo dependiendo de la temperatura de almacenamiento, hasta que el crecimiento o la muerte del microorganismo llegó a una situación estable: 96 horas para 5 y 10 °C y 24 horas para 22 °C. De los estudios llevados a cabo en la presente tesina de máster se concluye que los subproductos cítricos presentan capacidad antimicrobiana efectiva, pudiendo actuar como barrera a la proliferación microbiana, adicionados, por ejemplo, a bebidas pasteurizadas, prolongando la vida útil de las mismas en refrigeración. (11)

GUERRA L, SOTO L, MEDINA Z, OJEDA G. Y PEÑA J, Venezuela – Carabobo (2014) El objetivo de éste estudio fue obtener mediante el método de hidrodestilación, aceite esencial de las cortezas de naranjas cultivadas en el municipio Bejuma, estado Carabobo, Venezuela y determinar su actividad antibacteriana, frente a los microorganismos Gram negativos (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853), y Gram positivos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115). La extracción del aceite esencial se realizó mediante la hidrodestilación, las cepas caldo nutritivo (Himedia, India) y colocadas a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se sembraron en agar nutritivo (Himedia, India) a 37°C durante 24 horas. Para la incorporación de los aceites esenciales se prepararon las siguientes concentraciones del aceite esencial 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% empleando etanol como solvente de



dilución (RiedelHaën, Alemania). La actividad antibacteriana se determinó midiendo el halo de inhibición alrededor de cada orificio, considerando inhibitorio un valor $e \geq 1$ mm. En los resultados se obtuvieron que las cepas Gram positivas ensayadas fueron totalmente resistentes al aceite puro. En tanto las cepas Gram negativas presentaron sensibilidad a partir de 10%, por lo que se procedió a determinar la concentración inhibitoria mínima mediante el método de dilución en caldo a las cepas sensibles con concentraciones inferiores a las obtenidas en el método antes ensayado (Bauer-Kirby); para las cepas Gram negativas utilizándose 5, 6, 7, 8 y 9%. Se obtuvo una CIM para *P. aeruginosa* y *E. coli*. Obteniéndose halos de inhibición de entre 8 mm a la concentración de 10 % y un de inhibición halo de 10 mm a una concentración de 100%. (12)

2.1.2. ANTECEDENTES NACIONALES

ALBADO E, SAEZ G, GRABIEL S. Lima –Perú (2001). El objetivo de este estudio fue Determinar la actividad antimicrobiana en el aceite esencial del *Origanum Vulgare*, El método de extracción del aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de las hojas y flores desecadas de *Origanum Vulgare*. Se realizaron las pruebas bioquímicas y confirmativas de los microorganismos antes de cada utilización. Se reactivaron los microorganismos en TSB. Los microorganismos se inocularon en medio agarizado TSA, previamente fundido y enfriado a 45°C. Y para el método de disco difusión el inóculo se repartió de manera uniforme en la superficie del agar luego 4uL del aceite esencial fue embebido en discos de papel de filtro Wathman N°4. Se realizaron 4 repeticiones para cada microorganismo. Luego, las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. La lectura se efectuó mediante la medición de halos. Se evaluó a cepas patógenas referenciales tales como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae* (ATCC 14033), *E. coli* (ATCC 25923),



Salmonella cholerae suis (ATCC 14028) *Salmonella typhimurium* (aislado INS) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). El resultado de la investigación confirma que el aceite esencial del orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* no mostró sensibilidad frente al aceite esencial. (13)

ALZAMORA L, MORALES L, ARMAS L, FERNÁNDEZ G. Lima- Perú (2001) el objetivo de este estudio fue determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cinco plantas empleadas en Medicina Tradicional en el Perú: *Eucalyptus globulus*, *Labill eucalipto*; *Cymbopogon citratus*, (Staff hierba luisa); *Tagetes pusilla lag.* (Anís serrano); *Senecio tephrosioides*, *Turcz huamanripa* y *Lepechinia meyenii*, (Epling salvia). Como método de extracción de los aceites fue el de destilación por arrastre de vapor de agua a partir de plantas frescas, se activaron las cepas de *Salmonella* Gram (-), *S. typhimurium* Gram (-), *S. enteritidis* Gram (-), *Vibrio cholerae* Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-), *Shigella flexneri* Gram (-), *Staphylococcus aureus* INS Gram (+), *S. aureus* y *Cándida albicans*. Luego Los discos de papel Wathman N°1 de 6 mm de diámetro fueron impregnados, el mismo día de la prueba, con 5 mL de aceite esencial puro y filtrado; se los aplicó sobre los inóculos y se les incubó a 37°C por 18 horas. Los resultados que mostraron era que el aceite esencial que ejerció mayor efecto sobre los microorganismos evaluados fue el de “Hierba luisa” (88.8%) con un halo de inhibición antibacteriano de 36 mm, y el de menor grado fue el de Eucalipto. Sin embargo, ninguno de los cinco aceites empleados inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*. (14)

ROJAS J, SOLIS H, PALACIOS O, Lima- Perú (2010). El objetivo de este estudio fue determinar la actividad anti *Trypanosoma Cruzi* in vitro de los aceites esenciales de 10 plantas medicinales entre ellas el de *Cimnopogon citrus*. La actividad tripanosomica se evaluó en inóculos cultivados en un



medio LIT, incubados por 48 horas, como control positivo se usó el cristal violeta. Donde el *Cimnopogon citrus* (Hierba luisa) inhibió significativamente el crecimiento de la forma epimastigote de *T. cruzi*. No hubo variación significativa de la concentración de óxido nítrico y tampoco se evidenció citotoxicidad. Concluyendo que el aceite esencial de *Cimnopogon citrus* mostro actividad anti *tripanosoma cruzi* in vitro y no fue citotóxica para la células mamíferas. (15)



2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. PLANTAS MEDICINALES

2.2.1.1. PRINCIPIOS ACTIVOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Los principios activos son sustancias que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas y que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. (16)

Thompson (1981) refiere que el valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química – principio activo – que produce un efecto fisiológico. Mucho de los principios activos son sumamente complejos, desconociéndose aún su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados. La investigación científica ha permitido descubrir una variada gama de principios activos, de los cuales los más importantes desde el punto de vista de la salud, son los aceites esenciales, los alcaloides, los glucósidos o heterósidos, los mucílagos y gomas, y los taninos.(17)

2.2.2. ACEITES ESENCIALES

Anderzon Guarnizo, Pedro Nel (2009) Un aceite esencial es una mezcla volátil de compuestos orgánicos generalmente líquidos; de apariencia oleosa, derivado de plantas odoríferas por métodos físicos. Muchos de los aceites esenciales han sido valorados desde la antigüedad por sus olores característicos. Los aceites esenciales son usados por su atractivo olor como especias y agentes saborizantes en alimentos. Unos pocos son valorados por su acción antibacterial y fungicida. (18)

Según Afnor (1998), están compuestos por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas



obtenidos por métodos como: arrastre con vapor, por procedimientos mecánicos o bien por destilación seca. (19)

2.2.2.1. CLASIFICACIÓN

La clasificación de los aceites esenciales es muy compleja ya que se puede basar en varios criterios como: (20)

- Consistencia: pueden ser esencias fluidas (líquidos volátiles a temperatura ambiente), bálsamos (consistencia espesa, poco volátiles.) y oleorresinas (líquidos viscosos, con roma concentrado).
- Origen: natural, artificial o sintéticas
- Naturaleza química de los componentes mayoritarios: monoterpenoides, sesquiterpenoides o fenilpropanoides.

2.2.2.2. LOCALIZACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PLANTAS

Stashenko (2009) Los aceites esenciales se pueden encontrar en las diferentes células oleíferas (jengibre, cúrcuma, vainilla), en los canales secretores (pino, artemisia, anís, angélica), están presentes en las glándulas (cítricos, eucaliptos), o en los tricomas (muchas plantas de las familias labiadas, asteráceas, solanáceas, geraniáceas). (21)

2.2.2.3. COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN

Bruneton (2001) La composición química de los aceites depende del tipo de planta, su variedad, sus condiciones, lugar de cultivo y la duración del proceso de extracción. (21)

Según los grupos funcionales se puede tener (Cuadro 1):

CUADRO N° 1: Composición y función de los aceites esenciales

COMPUESTO	FUNCIÓN
Alcohol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico
Aldehído	Espasmolítico, sedante, antiviral
Cetona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico
Ester	Espasmolítico, sedativo, antifúngico
Éteres	Expectorante, estimulante
Éter fenólico	diurético, carminativo, estomacal, expectorante
Fenol	Antimicrobiano Irritante Estimulante inmunológico
Hidrocarburos	Estimulante descongestionante antivírico, antitumoral

Los compuestos fenólicos en las plantas se destacan en la actualidad en el campo de la nutrición, la salud y la medicina, ya que pueden actuar como potentes antioxidantes, anticancerígenos, anti fúngicos. (22)

2.2.2.4. ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES

Reyes Jurado, et al, Actualmente se sabe que los aceites esenciales derivados de las plantas y especias tienen efectos antimicrobianos. Se ha identificado que estos efectos están relacionados con los componentes químicos presentes. (23)



López, et al, La mayoría de los estudios han encontrado que los AE son efectivos contra numerosas bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-), mohos, levaduras, siendo los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos los posibles responsables de las propiedades aromáticas, antioxidantes y antimicrobianas de los AE. (23)

2.2.2.5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Cano (2007); El modo de acción de los AE también dependerá del tipo de microorganismos y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos. La acción de los AE sobre los dermatofitos es destruir la pared celular y la membrana citoplasmática; lo cual resulta ser un rompimiento del citoplasma y su coagulación. (24)

2.2.2.6. PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Propiedades Generales de los aceites esenciales :(24)

- Líquidos a temperatura ambiente.
- Volátiles.
- Aromáticos.
- Incoloros o amarillentos.
- Menos densos que el agua (canela y clavo: más densos que el agua)
- Insolubles en agua.
- Lipófilos.
- Solubles en disolventes orgánicos.
- Solubles en alcoholes de alta graduación.
- Índice de refracción elevado.
- Extraíbles por arrastre de vapor de agua.



2.2.2.7. APLICACIONES

Los aceites de plantas aromáticas desde antaño se usaban con propósitos mágico religiosas como drogas naturales, productos de aseo y belleza. Actualmente son una muy importante fuente de compuestos bioactivos, que a nivel industrial se obtienen no solamente por sus propiedades sensoriales, aprovechadas en sabores y fragancias, perfumes y lociones, sino también por su carácter conservante gracias a sus actividades antioxidantes y antimicrobianas que poseen. Lo que indica una mayor búsqueda de ingredientes naturales para su uso en alimentos, fármacos, cosméticos, productos de aseo personal, biorreguladores, dentífricos y otros. (25)

2.2.2.8. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

2.2.2.8.1. DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

PATRICIA (2013) Es el método más usado a nivel industrial, permite obtener aceite esencial con buenos rendimientos, y además se pueden procesar grandes cantidades de material vegetal. Aquí, la materia prima vegetal (molido, cortado, entero) es cargada de manera que forme un lecho fijo compactado. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno y próximo a su base. Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia vegetal se calienta y va liberando el aceite esencial, el cual debido a su alta volatilidad se evapora y al ser soluble en el vapor circundante es “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del destilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador mediante una prolongación curvada del conducto de salida del destilador. En el condensador, la mezcla es enfriada hasta la temperatura ambiental, a su salida, se obtiene una **emulsión agua - aceite**, la cual es separada en un decantador o florentino debido a la diferencia de densidades. (26)

2.2.2.8.2. EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

MARTINEZ (2003) En este método se utilizan disolventes que solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una oleorresina o un extracto impuro. Algunos disolventes utilizados tienen restricciones en cuanto a los residuos máximos que pueden dejarse cuando los aceites esenciales son la materia prima en las industrias de los perfumes o alimentos. Los extractos obtenidos por este método suelen ser más oscuros, ya que llegan a arrastrar algunos pigmentos, su solubilidad en alcohol diluido es menor recuperándose sus compuestos aromáticos. (27)

2.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES UTILIZADAS

2.2.3.1. CYMBOPOGON CITRATUS (HIERBA LUISA)

2.2.3.1.1. ORIGEN

Especie tropical perteneciente a la familia de las Gramíneas. Es originaria de la región suroriental de Asia y se encuentra ampliamente distribuida, en nuestro país las principales zonas de producción son: Lima, Cajamarca y Ucayali. (28)

2.2.3.1.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La hierba luisa, dentro de la botánica sistemática, se encuentra clasificada de la siguiente manera: (28)

- Reino : Cormobionta
 - División : Magnoliophyta
 - Clase : Liliatae (Liliopsida)
 - Subclase : Commelinidae
 - Orden : Cyperales
 - Familia : Poaceae



- Tribu :AndropogoneaeDumort
 - Género : Cymbopogon
 - Especie: citratus

2.2.3.1.3. BÓTANICA

Yerba perenne, robusta, culmos o tallos muy ramificados, de 1 a 2 m de alto con los nudos ceríferos. Hojas aromáticas, amontonadas cerca de la base, lampiñas, glaucas, de 6 a 10 dm, sus ramas alargadas y un tanto péndulas. (28).

2.2.3.1.4. COMPOSICIÓN

Cantidad relativa (%) de los componentes presentes en el aceite esencial de C. citratus (Cuadro 2): (28)

CUADRO N°2: *Composición de Cymbopogon Citratus (Hierba Luisa)*

<i>Cymbopogon Citratus</i>
Fenoles
Mirceno (0,6%)
Linalool (1,5%)
Geraniol (10,1%)
Geranial (41,8%)



2.2.3.2. FOENICULUM VULGARE (HINOJO)

2.2.3.2.1. ORIGEN

Tiene su origen en la cuenca del Mediterráneo. Existen reportes del consumo de hinojo desde hace más de 2000 años. (29)

2.2.3.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Se encuentra clasificada de la siguiente manera: (29)

- Reino:Plantae
 - División: Magnoliophyta
 - Clase:Magnoliopsida
 - Orden: Apiales
 - Familia: Apiaceae
 - Subfamilia: Apioideae
 - Tribu:Apieae
 - Género:foeniculu
 - E:f.vulgar

2.2.3.2.3. BOTÁNICA

Es una hierba, erecta, perenne, de 1 m de alto o menos, de hojas con forma muy disectada por dentro, segmentadas o capiladas, presenta umbelas largas con 9-25 flores radiadas; robustas a menudo glaucas de 2.5 a 7 cm. de longitud, algunas presentan cerca de 6 mm de longitud. (29)

2.2.3.2.4. COMPOSICIÓN

Los principales constituyentes son (Cuadro 3): (29)

CUADRO N° 3: Composición del *Foeniculum Vulgare* (hinojo)

<i>Foeniculum Vulgare</i>
Metil- cravicol
Diversos aldehídos
Glucoronidos de flavonoides
Ácido anisico

2.2.3.4. ORIGANUM VULGARE (ORÉGANO)**2.2.3.4.1. ORIGEN**

Es cultivado en Tacna (Tarata) en gran escala, cosechado, desecado y distribuido a los mercados nacionales y al exterior. Se utiliza en la preparación de alimentos. Las hojas y sumidades floridas se aplican en el campo farmacéutico debido a las propiedades tónicas, amargoexcitantes, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas. (30)

2.2.3.4.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El orégano, dentro de la botánica sistemática, se encuentra clasificada de la siguiente manera: (30)

- Reino: Plantae
 - División: Magnoliophyta
 - Clase: Magnoliopsida
 - Orden: Lamiales
 - Familia: Lamiaceae

- Subfamilia: Nepetoideae
 - Tribu: Mentheae
 - Género: Origanum
 - Es: O. Vulgare

2.2.3.4.3. BOTÁNICA

Planta aromática, leñosa en la base con tallos herbáceos de hasta 1m de altura, hojas pecioladas, ovadas en general, algo pelosas con una superficie punteada por unas glándulas esferoidales que contienen las esencias. Las flores se encuentran reunidas en inflorescencias esféricas o alargadas.

2.2.3.4.4. COMPOSICIÓN

EL orégano está compuesto por (Cuadro n° 4): (30)

CUADRO N°4: Composición de *Origanum Vulgare* (orégano).

<i>Origanum Vulgare</i>
Timol (1.47%)
Terpineol (2.76%)
Carvacrol (7.72 %)
P. cimeno (8.39 %)

Otras publicaciones sobre la composición química del aceite esencial de *Origanum Vulgare*, informan diferentes rendimientos según el tiempo y modo de proceso desde su recolección hasta su extracción. El aceite esencial obtenido a partir del orégano de los mercados contiene los compuestos citados para el *Origanum Vulgare*. La naturaleza de las bacterias sensibles al



aceite de orégano justifica su uso popular en la preparación y conservación de los alimentos. (31)

2.2.3.5. CÍTRICOS

2.2.3.5.1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN

Las numerosas especies del género Citrus provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago Malayo; desde allí se distribuyeron a las otras regiones del mundo donde hoy se cultivan cítricos. Los cítricos se cultivan desde épocas remotas (más de 4000 años). Sus frutas atrajeron la atención de los pueblos primitivos. (32)

El **centro de origen de los limones** (C. limón. Burmann), es totalmente desconocido. Se cree que son híbridos de lima y cidra (32)

La **naranja dulce** (C. Sinesis) (L.Osbeck), originaria del sudeste de China, probablemente haya sido llevada a Europa por los romanos. Sin embargo hay evidencias del cultivo de naranjas antes de la destrucción de Pompeya (ocurrida en el año 79 D.C.), según se observa en un mosaico entre las ruinas de la ciudad. Se sabe con certeza que las naranjas fueron cultivadas por varias centurias en China, antes que los europeos la conocieran y sus referencias se encuentran en manuscritos y documentos muy antiguos. (32)

Una vez en América y desde el Caribe y Brasil (adonde llegaron primero), los cítricos se extendieron por todo el continente llevados por misioneros de la Iglesia Católica. (32)

2.2.3.5.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA:

Mabberley (1997) propuso una clasificación pragmática de los principales *citrus* cultivados de modo que aclarase el caos que muchas veces hay según se consulten unas fuentes u otras. Esta clasificación simplifica y

aclara el género y parece contar con el consenso de los principales botánicos: (33)

- Reino: Plantae
 - División: Magnoliophyta
 - Clase: Magnoliopsida
 - Subclase: Rosidae
 - Orden: Sapindales
 - Familia: Rutaceae
 - Subfamilia: Citroideae
 - Tribu: Citreae
 - Género: Citrus
 - Sub Géneros.

2.2.3.5.3. COMPOSICIÓN DE CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE (LIMÓN)

Composición química del aceite esencial (Cuadro 5): (34)

CUADRO N° 5: Composición de *Citrus Aurantifolia Swingle* (limón)

<i>Citrus Aurantifolia Swingle</i>
Limoneno
Citral
Terpinol
Citropteno

2.2.3.5.4. COMPOSICIÓN DE CITRUS SINENSIS (NARANJA)

Composición química del aceite esencial (Cuadro 6) (35)

CUADRO N° 6: Composición de *Citrus Sinesis* (naranja)

<i>Citrus Sinesis</i>
Limoneno
β -Linalol
Decanal
2(10)-Pino

2.2.4. PLACA BACTERIANA DENTAL

Durante años se ha puesto especial interés en determinar la función ejercida por la placa bacteriana dental en el inicio de la lesión cariosa en lugares específicos del diente. La placa dental ha sido definida como: una masa blanda, translúcida y muy adherente que se acumula sobre la superficie de los dientes, formada casi exclusivamente por bacterias y sus subproductos. La OMS la define como “Una entidad bacteriana proliferante enzimáticamente activa, que se adhiere firmemente a la superficie dentaria y que por su actividad bioquímicamente metabólica ha sido propuesta como el agente etiológico principal en el desarrollo de la caries”. (36)

Sólo algunas especies bacterianas, en especial el *Streptococcus Mutans*, son capaces de adherirse a las superficies bucales como la mucosa y superficie dentaria. Estas bacterias adherentes disponen de receptores especiales y producen, además, una matriz pegajosa, el dextrán, que les permite cohesionarse fuertemente entre sí. El crecimiento bacteriano posterior es en volumen, vertical sobre la superficie del diente hacia el exterior. (36)



2.2.4.1. MICROBIOLOGÍA BUCAL

La microbiología oral estudia de forma especial las bacterias, los hongos y los virus de la cavidad bucal, la respuesta de sus tejidos frente a los microorganismos, las relaciones que estos establecen entre sí y con dicha cavidad, y las enfermedades infecciosas propias del ámbito odontológico. (37)

2.2.4.2. GÉNERO STREPTOCOCCUS

Los Streptococos son cocos Gram (+) que se disponen en parejas o cadenas. Al cultivarlos en agar sangre producen distintos grupos de Hemolisis con propiedades fenotípicas y de características genéticas y químicas estructurales, han permitido establecer una clasificación poco estable y muy dada a sufrir variaciones en el curso de tiempo. Las especies más significativas en patología humana son: *S. pyogenes* relacionado con faringitis y reacciones inmunopatológicas, *S. pneumoniae* (neumococo), causante de neumonía se puede complicar con septicemias y meningitis, *S. agalactiae*, que produce infecciones neonatales; y un conjunto de Streptococos reunidos bajo la denominación de viridans, que son particularmente importantes en la cavidad oral. (37)

Presentan un metabolismo fermentativo y producen esencialmente ácido láctico; la génesis de ácidos pueden ser tan importantes que el descenso del pH provocaría su autólisis, de ahí que los medios de cultivo deban ir tamponados, especialmente si contienen azúcares y son líquidos. En los caldos, el crecimiento es muy variable, desde turbidez homogénea a granular, su temperatura óptima de desarrollo es de $36 \pm 1^\circ$ y en relación con las condiciones de cultivo son muy variables desde los más exigentes hasta los que incluso se desarrollan en condiciones hostiles. (37)



2.2.4.2.1. GRUPO VIRIDANS

Estas bacterias tienen un hábitad principalmente en la cavidad oral colonizan tanto superficies duras como blandas y son los microorganismos más abundantes en todos sus ecosistemas primarios; por estas circunstancias son denominados por muchos como Streptococos orales. Su patogenicidad más importante va ligada a la formación de placas y a la producción de caries también se relaciona con la gingivitis. (37)

2.2.4.2.1.1. ESTREPTOCOCCUS MUTANS

Estructuralmente no difieren del modelo general de todos los Streptococos, salvo en la ausencia de cápsula, de los antígenos que definen los serogrupos. Posee una capa mucosa cuya composición siempre hay glucanos tanto solubles como insolubles por lo que posee glucosiltransferasa de bajo y alto peso molecular, posee polisacáridos en la pared celular que permiten distinguir los serotipos a,b,c,d,e,f,g y h que están presentes en forma variable en las diferentes especies. (37)

En su pared presentan proteínas frecuentemente antigénicas y también involucradas en diversos fenómenos; fijación de glucanos, adhesión a la película adquirida y adhesión interbacteriana por interacciones proteína-proteína o lectina-carbohidratos que a veces se ve favorecida por la saliva gracias a la mediación conjunta de cationes y glucoproteínas salivales. (37)

2.2.4.2.1.2. ADQUISICION DE STREPTOCOCCUS MUTANS

StreptococcusMutans se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debida fundamentalmente a que requiere la presencia de tejido duro no descamativo para su colonización. La principal fuente de adquisición y transmisión de StreptococcusMutans en los niños es la saliva de su madre. Estas evidencias provienen de diferentes estudios que han mostrado un idéntico patrón de DNA cromosomal en las bacterias de los niños de su madre. Actualmente, los estudios no solo están enfocados en la



búsqueda de Streptococcus Mutans en saliva y placa dental, sino también en su cuantificación. (38)

2.2.4.2.1.3. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL STREPTOCOCCUS MUTANS

Se pueden emplear diferentes medios para su aislamiento y posterior identificación. Tales como: (37)

SÓLIDOS

- No selectivos, como agar sangre, en el que las colonias aparecen alfa o γ -hemolíticas con excepción de algunas cepas de Streptococcus Mutans que son beta - hemolítica.
- Selectivas para Streptococcus orales, como MSA (mitis-salivarius-agar) que contienen entre otros compuestos 5 % de sacarosa como sustancias inhibidoras de otras bacterias.
- Selectivos para los Streptococcus del grupo Mutans como MSB (mitis-salivarius- bacitracina), con 0.2 U/ml de bacitracina y sacarosa al 20%.

LÍQUIDOS

Pueden utilizarse distintos caldos siempre y cuando ofrezcan suficientes nutrientes para su desarrollo (BHI, TSB y caldo Schaedler). El crecimiento es casi siempre de tipo granular adheridos a las paredes de los tubos de ensayo.

2.2.5 CARIES DENTAL

2.2.5.1. DEFINICIÓN DE CARIES

La caries dental es una enfermedad microbiana infecciosa de los dientes cuya consecuencia es la destrucción de los tejidos calcificados afectados, o sea el esmalte la dentina y el cemento. Las lesiones cariosas suelen aparecer debajo de masas de colonias bacterianas conocidas como “placa



dental”. El comienzo de la caries dental se asocia fundamentalmente con colonias bacterianas de *Streptococcus Mutans* mientras que la progresión activa de la enfermedad se asocia con el lactobacilos. Estas colonias de bacterias metabolizan carbohidratos y producen un ambiente ácido que desmineraliza la estructura dentaria subyacente. La ingestión frecuente de sacarosa tiene una asociación estrecha con el desarrollo de estas colonias bacterias acidógenas. (39)

2.2.5.2. ETIOLOGÍA DE LA CARIES DENTAL

2.2.5.2.1. FACTORES PRIMARIOS:

Para la iniciación y avance de la caries dental es necesaria la interacción de tres factores primarios: (40)

2.2.5.2.1.1. **Tejido huésped** susceptible: la morfología del diente (superficie propicia retentiva de placa), la disposición en la arcada, su textura superficial, el medio oral en que se encuentra (papel fundamental de la saliva) y predisposición genética del individuo. (40)

2.2.5.2.1.2. **Microflora bucal** con potencial cariogénico: Las bacterias que colonizan la boca producen sustancias químicas que pueden destruir el esmalte y la dentina. En particular, se sabe que el *Streptococcus Mutans* es el organismo aislado más importante en la iniciación de la caries. Esta bacteria actúa metabolizando fundamentalmente hidratos de carbono o azúcares que existe en la superficie dentaria. (40)

2.2.5.2.1.3. **Sustrato local adecuado** para una flora patodóntica. La ingesta frecuente y entre horas de azúcares (en especial sacarosa) y más si la cualidad del alimento es pegajosa o viscosa proporciona los requisitos nutricionales y energéticos para la Microflora permitiéndole colonizar, crecer y metabolizar sobre superficies dentarias selectivas. A estos factores habría que añadir uno adicional pero no menos importante que es el tiempo de interrelación entre los anteriores. (40)



2.2.5.2.2. TEORÍA QUÍMICO PARASITARIA

La teoría de Miller expresa que la caries se desarrolla como resultado de la capacidad de las bacterias de producir ácidos a partir de hidratos de carbono provenientes de la dieta. Los resultados obtenidos por Miller indicaron que un simple grupo o especie microbiana podría explicar la caries dental. Reiteradas evidencias experimentales sustentaron de manera definitiva los postulados de Miller respecto de una etiología infecciosa múltiple. Más tarde L Williams y Black demostraron la importancia de la placa gelatinosa en la iniciación de la caries. (41)

2.2.5.3. PELÍCULA ADQUIRIDA

La película adquirida salival, o simplemente película adquirida (PA), es una delgada membrana biológica que se deposita en la superficie de los elementos dentarios , como resultado de la absorción de proteínas y glucoproteínas contenidas en la saliva y el líquido crevicular, así como también otras provenientes de productos microbianos y celulares . La absorción de dichas biomoléculas no ocurre exclusivamente sobre tejido adamantino, sino que existe PA en todas las superficies bucales (cemento, mucosas, epitelio bucal queratinizada y no queratinizada), aparatos protésicos y restauraciones, cada una de ellas de composición química diferente. (42)

2.2.5.3.1. COMPOSICIÓN: Los componentes glucídicos de la PA comprenden principalmente azúcares neutros (glucosa, galactosa) y amino azúcares (glucosamina, galactosamina); en menor proporción participan también otros glúcidos derivados. (42)



2.2.6 GLUCONATO DE CLORHEXIDINA

2.2.6.1. DEFINICIÓN Y ANTECEDENTES DE LA CLORHEXIDINA

La clorhexidina ha sido estudiada durante un par de décadas como un potente agente antimicrobiano usado para el control químico de la placa dentobacteriana y la prevención de caries. Debido a sus propiedades, la clorhexidina es aceptada como el producto más efectivo en el control de la placa supra gingival. (43)

2.2.6.2. MECANISMO DE ACCIÓN

La estructura molecular del gluconato de clorhexidina; es la responsable de su mecanismo inhibitor ya que existe una relación directa entre estructura molecular y su proceso de acción, y es de esta manera que se inicia la desintegración del medicamento dentro de la anatomía del sistema de conductos radiculares produciendo una molécula catiónica que se une fuertemente a la membrana celular de las bacterias que presentan carga negativa, causando graves alteraciones en el equilibrio osmótico bacteriano, y alterando de esta manera la bomba de sodio y potasio, también bloquea la transferencia de magnesio y calcio, filtrando sus componentes intracelulares; originando de esta manera la muerte celular. En bajas concentraciones tiene actividad bacteriostática, en altas concentraciones causará la coagulación y precipitación del citoplasma bacteriano. (44)

2.2.6.3. APLICACIONES CLÍNICAS

GINGIVITIS – PERIODONTITIS: No sólo asociada a placa, también es efectiva en el tratamiento de gingivitis necrosante aguda y crónica. Útil combinado con el tratamiento periodontal, ya que tras el raspado y alisado radicular, la resolución del tejido inflamado depende del control efectivo y diario de la placa. Así la utilización de colutorios de clorhexidina está



justificada como han demostrado los estudios de Lee y Schiettt, (1970), Bosman y Powell, (1977). (45)

CIRUGÍA PERIODONTAL: Todos los estudios están de acuerdo en que la clorhexidina es un buen complemento terapéutico en el control de la inflamación gingival. (45)

ALVEOLITIS: Diversos estudios han concluido una disminución en la incidencia de alveolitis post-extracción con el uso de colutorios de clorhexidina, Tjenberg (1999), (45)

2.3. MARCO CONCEPTUAL

PRINCIPIO ACTIVO: Son la sustancia a la cual se debe el efecto farmacológico de un medicamento, y su uso se remonta a la prehistoria, en un principio eran hierbas, con el pasar del tiempo se aislaron los componentes de las plantas, y finalmente en el siglo XX se logró identificar la estructura molecular de muchas de ellas. (46)

ACEITE ESENCIAL: Producto químico intensamente aromático, no graso, volátil por naturaleza y liviano. Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. Se han extraído más de 150 tipos, cada uno con su aroma propio y virtudes curativas únicas. (47)

COMPUESTOS FENÓLICOS: Son definidos como sustancias que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidróxilo, incluyendo a sus derivados funcionales. (48)

DESTILACIÓN: Es el proceso de separar las distintas sustancias que componen una mezcla líquida mediante vaporización y condensación selectiva. Dichas sustancias, que pueden ser componentes líquidos, sólidos disueltos en líquidos o gases licuados, se separan aprovechando los diferentes puntos de ebullición de cada una de ellas, ya



que el punto de ebullición es una propiedad intensiva de cada sustancia, es decir, no varía en función de la masa o el volumen, aunque sí en función de la presión. (47)

RESISTENCIA BACTERIANA: Capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos o biosidas destinados a eliminarlas o controlarlas. (49)

SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA: Determina la efectividad de los antibióticos contra microorganismos (microbios), como bacterias, que han sido aislados en los cultivos. (49)

IN VITRO: Estudio biológico en medio de cultivo para el desarrollo bacteriano, su manejo es en un laboratorio microbiológico. (50)

2.4. HIPÓTESIS

Hi: El efecto antibacteriano IN VITRO de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cymbopogon Citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus Aurantifolia Swingle* (Limón) y *Citrus Sinesis* (Naranja) será diferente al del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% frente a las cepas de *Streptococcus Mutans*.

Ho: El efecto antibacteriano IN VITRO de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cymbopogon Citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus Aurantifolia Swingle* (Limón) y *Citrus Sinesis* (Naranja) será igual al del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% frente a la cepa de *Streptococcus Mutans*.

HIPÓTESIS ALTERNA: El efecto antibacteriano IN VITRO de los aceites esenciales de: *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cymbopogon Citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus Aurantifolia Swingle* (Limón) y *Citrus Sinesis* (Naranja) será mayor al del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% frente a la cepa de *Streptococcus Mutans*.



2.5. VARIABLES E INDICADORES

2.5.1. VARIABLE DEPENDIENTE

Streptococcus Mutans ATCC 25175

2.5.2. VARIABLE INDEPENDIENTE

Efecto Antibacteriano de los Aceites esenciales de:

- Aceites esencial de Foeniculum Vulgare (Hinojo)
- Aceite esencial de Cimbopogon Citrus (Hierba Luisa)
- Aceite esencial de Origanum Vulgare (Orégano)
- Aceite esencial de Swingle (Limón)
- Aceite esencial de Citrus Sinesis (Naranja)

2.5.3. VARIABLE INTERVINIENTE

- Tiempo

2.5.4. VARIABLE CONTROL

- Clorhexidina al 0.12%

2.6. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES



VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA DE LA VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	FORMA DE MEDICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL
EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES	Es la inhibición en el crecimiento de las bacterias debido a la presencia de los aceites esenciales de Hinojo, Hierba Luisa, Orégano, Limón, Naranja	Cualitativa	Nominal	Directa	Aceite esencial de Hinojo Aceite esencial de Hierba Luisa Aceite esencial de Orégano Aceite esencial de Limón Aceite esencial de naranja	Todos los aceites tendrán una concentración al 100%	Ficha de recolección de datos	Hinojo (1) Hierba luisa (2) Orégano (3) Limón (4) Naranja (5)	La variable efecto antibacteriano de los aceites esenciales se expresa: con los números 1, 2, 3, 4,5, tomando en cuenta como indicador: todos los aceites tendrán una concentración al 100%, y como instrumento de medición se utilizará la ficha de recolección de datos.
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICIÓN	FORMA DE MEDICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL
STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175	Bacteria Gram +, anaerobia facultativa, asociado al inicio y desarrollo de la caries dental	Cuantitativa	Ordinal	Directa	≤ 9 mm 10-11 mm 12-19 mm ≥ 20 mm	Halo mínimo de inhibición dentro de la UFC	Ficha de recolección de Datos.	Resistente Sensible límite Sensible medio Súper sensible	La variable Streptococcus Mutans se expresa como: R, SL, SM, SS y como indicadores al halo mínimo de inhibición dentro de la UFC tomando como dimensión a un rango de ≤ 9 a ≥ 20 mm y como instrumento la ficha de recolección de resultados.



VARIABLE INTERVINIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA	ESCALA DE MEDICIÓN	FORMACION DE MEDICIÓN	DIMESIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL
TIEMPO	Período determinado durante el que se realiza una acción o se desarrolla un acontecimiento	Cuantitativa	Intervalar	Directa	Rango entre las 24 y 72 horas	Registro a las 24, 48 y 72 horas.	Ficha de recolección de Datos Cronómetro	24 hrs. 48 hrs. 72 hrs.	La variable tiempo se expresa: en horas utilizando como indicadores el registro a las, 24,48 y 72 horas mediante el instrumento del cronómetro.
VARIABLE CONTROL	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA A	ESCALA DE MEDICIÓN	FORMA DE MEDICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADORES	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	EXPRESIÓN FINAL DE LA VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL
GLUCONATO CLORHEXIDINA AL 0.12%	Es un agente antimicrobiano usado para el control químico de la placa dento-bacteriana y la prevención de caries	Cualitativa	Nominal	Directa	Gluconato de Clorhexidina	Concentración al 0.12%	Ficha de recolección de datos	0	La variable control gluconato de clorhexidina se expresa como: número 0, tomando en cuenta como indicador la concentración al 0.12% y como instrumento de medición se utilizará la ficha de recolección de datos.



CAPÍTULO III

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

- **NIVEL:** EXPLICATIVO ANALÍTICO EXPERIMENTAL

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

- **ALCANCE:** Cualitativo - cuantitativo.
- **ÁMBITO:** Laboratorial
- **TÉCNICA:** Observacional
- **TEMPORALIDAD:** Longitudinal prospectiva.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

El tamaño de la muestra para el presente trabajo estuvo constituida por 17 cajas Petri inoculadas con las cepas de Streptococcus Mutans ATCC 25175, 3 cajas Petri correspondientes para cada aceite esencial con 3 pads, y 2 cajas Petri para el patrón control con 3 pads. Por lo cual, el muestreo es no probabilístico por conveniencia.

POBLACIÓN

- 17 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus Mutans ATCC 25175.

MUESTRA

- 3 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 para aceite esencial de FOENICULUM VULGARE (HINOJO)
- 3 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 para aceite esencial de CIMBOPOGON CITRUS (HIERBA LUISA)
- 3 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 para aceite esencial de ORIGANUM VULGARE (OREGANO)
- 3 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 para aceite esencial de CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE (LIMON)



- 3 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 para aceite esencial de CITRUS SINESIS (NARANJA)
- GRUPO CONTROL: 2 Cajas Petri inoculadas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 para Gluconato de Clorhexidina al 0.12%.

3.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

- Cajas Petri de Streptococcus Mutans ATCC 25175 no contaminadas.

Criterios de exclusión

- Cajas con fecha expirada del Streptococcus Mutans. ATCC 25175
- Cajas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 q no hayan sido correctamente refrigeradas previa activación.

3.5. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1. TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Se utilizó como técnica la observación del procedimiento microbiológico.

3.5.2. INSTRUMENTO

Se utilizó como instrumento para la recolección de datos:

“FICHA DE RECOLECCION DE DATOS” elaborado por las investigadoras, donde los datos obtenidos en los laboratorios fueron registrados, todos estos de manera codificada. (Véase ANEXO 1)

3.6. TÉCNICA DE PROCESAMIENTO DE DATOS

3.6.1. PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS (Véase ANEXO 4)

3.6.1.1. RECOLECCIÓN DE PLANTAS Y FRUTAS

Se recolectó 2 kg de las especies: Foeniculum Vulgare (hinojo), Cimbopogon Citratos (Hierba Luisa) y Origanum Vulgare (Orégano), Citrus Aurantifolia Swingle



(Limón) y Citrus Sinesis (Naranja), en el Mercado de San Pedro de la ciudad del Cusco.

3.6.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA

Para este estudio se utilizó como materia prima las hojas y las cascaras, debido a que son la parte de las plantas y frutos más usadas en la medicina tradicional.

3.6.1.3. SECADO

Se dejó secar las especies vegetales por un tiempo de 2 semanas, a condiciones atmosféricas normales: temperatura ambiental en rango de 7– 21 °C, humedad relativa de 55 %, y presión atmosférica de 691.16 Hpa, bajo sombra (para evitar que la exposición constante de los rayos solares produzca la modificación de los aceites contenidos).

3.6.1.4. EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL MÉTODO DESTILACIÓN POR ARRASTE A VAPOR

Antes de iniciar la extracción se verificó el correcto armado de nuestro equipo de destilación, el cual estuvo conformado por una caldera que funcionó a gas, un contenedor metálico (olla a presión), un tubo condensador de vidrio que fue el serpentín, y un colector de líquidos dispuesto inmediatamente a la salida del condensador que fue una pera de decantación.

Posteriormente se colocó en el contenedor metálico 2kg de la materia prima, la muestra fue sometida (durante una hora) al flujo de vapor producido, así, conforme el vapor entrara en contacto directo con la materia prima se calentara y liberara el aceite esencial contenido, dicho aceite debido a su alta volatilidad se evaporó, y al ser soluble en el vapor circundante fue “arrastrado” corriente arriba hacia el tope del destilador.

La mezcla de vapor saturado y aceite esencial fluyó a través del ducto de vidrio y se dirigió hasta el serpentín interno del condensador, donde precisamente se condensó y enfrió por efecto del intercambio de calor con el agua corriente que lo



circunda, dicho líquido de refrigeración fue inyectado al condensador con un caudal de 0,016 l/s y salió del mismo con un caudal de 0,004 l/s.

A la salida del condensador se obtuvo una emulsión líquida inestable que fue recibida en un colector de vidrio volumétrico (pera de decantación), donde ocurrió la división de fases a causa de la diferencia de densidades, entre el agua y el aceite.

Finalmente la emulsión que fue recibida en un colector volumétrico (pera de decantación) fue retirada y almacenada en un tubo de ensayo esterilizado y a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

3.6.2. PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

Primero realizamos una prueba piloto para comprobar si realmente existía efectividad antibacteriana de los aceites esenciales de: hinojo, hierba luisa, orégano, limón y naranja sobre las cepas de Streptococcus Mutans. (Véase ANEXO 5-6)

3.6.2.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA CEPA BACTERIANA (Véase ANEXO 6)

- **OBTENCIÓN DE LA CEPA ESTANDARIZADA STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175**

Las cepas bacterianas de Streptococcus Mutans ATCC 25175 fueron obtenidas del laboratorio de referencia GEN LAB del Perú S.A.C.

3.6.2.2. ACTIVACIÓN DE CEPAS

Las cepas fueron refrigeradas a una temperatura de 7 °C, hasta el momento de su activación en el laboratorio SERVISALUD, Se procedió a coger una asada bacteriana y se inoculó en un tubo de ensayo con caldo Cerebro –Corazón Infusión (BHI), se dejó incubar por 24 horas a 36.7 °C.

3.6.2.3. MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó el medio de cultivo Müller Hinton Agar Sangre.



El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), ex National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), recomendó su uso en forma rutinaria para la realización del antibiograma en medio sólido, debido a una serie de factores que se detallan a continuación: presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetopina y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo.

Se preparó según las indicaciones de la casa comercial:

Para 38 gr agar deshidratado se necesitará 1000 ml de agua destilada

Entonces para 400 ml se necesitara x gr

38 gr _____ 1000 ml

X gr _____ 400 ml x= 15,2 gr

En una balanza analítica pesamos 15,2 gr de agar deshidratado, luego lo echamos a un matraz adicionando 400 ml de agua destilada, lo llevamos a fuego lento agitando hasta disolver el polvo convirtiéndose en una solución molar, pero no debe llegar a una temperatura de ebullición, de lo contrario perderá sus propiedades de consistencia, dejamos entibiar y agregamos 2% de sangre humana para mantener el crecimiento de las bacterias de manera equilibrada, posterior a esto tapamos la boquilla del matraz con papel aluminio y lo llevamos al autoclave por 15 min a 121 °C. Luego de esto pasó por un control durante 24 horas en la incubadora para evitar la formación de colonias y la contaminación de nuestro medio de cultivo.



3.6.2.4. DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DISCO-DIFUSIÓN

- **INOCULACIÓN DE PLACAS**

Se introdujo un hisopo esterilizado dentro de la suspensión y al retirarlo debe ser rotado varias veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo.

Se inoculó las placas de Müller-Hinton completamente, sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el hisopo estéril por la superficie del agar tres veces, rotando la placa unos 60° cada vez y pasándola por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar los discos.

- **DISPENSACIÓN DE LOS DISCOS**

Se preparó discos de papel filtro (wathman) con un aproximado a 6mm de diámetro previamente esterilizados en autoclave (121°C / 15 min). Manualmente fueron colocados con una pinza estéril, se debe asegurar que contacten perfectamente con la superficie del agar, por lo que se presionó ligeramente sobre la superficie del agar. No se situó a menos de 15 mm del borde de la placa, y serán distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición.

Posteriormente se incorporó a los discos de papel filtro con la ayuda de una micropipeta el siguiente volumen 10 ul de los aceites esenciales.

Para los grupo Control se colocó los discos de papel filtro embebidos con clorhexidina al 0.12% sobre la superficie inoculada en el medio de cultivo.

- **INCUBACIÓN**

Las placas fueron llevadas a incubar en posición invertida a 36.7 °C las primero 24 hrs.



3.6.2.5. MEDICIÓN DE DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO

Después de 24 horas de incubación se leyó el diámetro de los halos de inhibición (mm) sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 alrededor del disco; se utilizó el Viener (regla milimetrada). (ANEXO N° 7)

3.6.2.6. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Para la interpretación de los resultados se tomó como referencia las pautas dadas por Duraffourd y Lapraz (1983):

- **Resistente:** Para un diámetro inferior o igual a 9 mm.
- **Sensibilidad límite:** Para un diámetro entre 10 a 11 mm.
- **Sensibilidad media:** Para un diámetro comprendido entre 12 a 19 mm.
- **Sumamente sensible:** Para un diámetro superior o igual a 20 mm.

3.7. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó una ficha de datos en el cual se anotó los resultados de la prueba de difusión en agar Müller Hilton con discos, la recolección de datos se realizó de forma manual y visual.

La lectura se realizó con la medición de los halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco.

Los resultados se obtuvieron de acuerdo a las variables, objetivo e hipótesis, para eso se usó un método de análisis estadístico. Estos análisis se realizaron con el Software SPSS 15. Para hallar las diferencias significativas entre los diferentes aceites esenciales se realizó un análisis de varianza ANOVA de POST HOT la prueba HDS de Turkey para identificar que aceite esencial será el más efectivo con un nivel de significancia del 5%.

3.8. PROCEDIMIENTOS ADMINISTRATIVOS

Se solicitó autorización para la investigación experimental en laboratorios particulares de microbiología y química. (Véase ANEXO 2-3)



3.9. RECURSOS Y MATERIALES

3.9.1. EQUIPOS DE LABORATORIO QUIMICO PARA EXTRAER ACEITE ESENCIAL

- Destilador.
- Balanza Digital.
- Refrigeradora.
- Cocina a gas.

3.9.2. MATERIALES DE LABORATORIO QUÍMICO PARA EXTRAER ACEITE ESENCIAL

- Olla presión
- Pera de decantación
- Vaso precipitado
- Agua destilada
- Serpentín de vidrio

3.9.3. EQUIPOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- Incubadora
- Refrigeradora
- Esterilizador autoclave

3.9.4. MATERIALES DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA PARA CULTIVO DE BACTERIA

- Placas Petri de 15 x 100 ml
- Pipetas digitales
- Tubos de ensayo
- Matraz
- Guantes
- Mascarillas Descartables
- Mandil descartable
- Gorros descartables



- Lentes de protección
- Hisopos Estériles
- Gradilla para tubos de ensayo
- Asas de siembra
- Probetas
- Suero Fisiológico
- Mechero
- Discos de papel filtro Wathman 3
- Alcohol
- Pinzas estériles
- Micro pipeta

3.9.5. MEDIO DE CULTIVO PARA ACTIVACIÓN DE STREPTOCOCCUS MUTANS

CALDO BHI

3.9.6. MEDIOS DE CULTIVO

- Müeller Hinton Agar

3.9.7. SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS

- Aceites esenciales de Hinojo, Hierba Luisa, Orégano, Limón, Naranja.
- Gluconato de clorhexidina al 0.12%

3.9.8. MATERIALES PARA CUATIFICAR RESULTADOS

- Vernier calibrado
- Cámara Digital
- Ficha de recolección de datos

3.9.9. MATERIALES DE ESCRITORIO

- Papel Bond A4
- Lapiceros
- Lápices



- Corrector
- Borradores
- Cinta adhesiva
- Impresora
- Computadora
- Plumón Indeleble

3.10. RECURSOS FINANCIEROS

Financiado por las propias investigadoras.

3.11. RECURSOS HUMANOS

- **INVESTIGADORAS:** Liseth Karina Baca Zans
Adriana Yábar Fluker
- **ASESORA:** C.D. Esp. María Soledad Mendoza Antezana.

3.12. RECURSOS FÍSICOS

- Laboratorio Particular de microbiología SERVISALUD.
- Laboratorio Particular de Química del Ing. Mario Cumpa
- Biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Andina del Cusco.
- Internet.

CAPITULO IV

RESULTADOS DE LA INVESTIGACION

TABLA N°1: Estudio de ANOVA de POST HOC

ACEITES ESENCIALES	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12%	3	12.667	1.1547	.6667	9.798	15.535	12.0	14.0
ACEITE DE HINOJO	6	15.000	.8944	.3651	14.061	15.939	14.0	16.0
ACEITE DE HIERBA LUISA	9	32.967	6.5391	2.1797	27.940	37.993	27.0	48.0
ACEITE DE OREGANO	9	15.889	3.6553	1.2184	13.079	18.699	12.0	24.0
ACEITE DE LIMON	6	9.333	3.7238	1.5202	5.425	13.241	5.0	16.0
ACEITE DE NARANJA	9	14.667	1.0000	.3333	13.898	15.435	14.0	17.0
Total	42	17.993	8.9430	1.3799	15.206	20.780	5.0	48.0
F= 37.098					P=0.000			
FUENTE: Ficha de recolección de datos.								

TABLA N° 1: Mediante la prueba de ANOVA los aceites esenciales de Hinojo, Hierba Luisa, Orégano, Limón, Naranja y Gluconato de Clorhexidina al 0.12% tienen distribución normal porque el p_valor es menor a 0.05 para cada uno de ellos es mayor que su nivel significancia, con F= 37.098 se asume que estadísticamente existe diferencias en los aceites esenciales. También se observa que el aceite de Hinojo al 100% inhibió en promedio al Streptococcus Mutans en 15 mm, el aceite esencial de Hierba luisa al 100 % inhibió en promedio al Streptococcus Mutans en 32.967mm, para el aceite esencial de Orégano al 100% inhibió en promedio al Streptococcus Mutans en 15,889 mm, para el aceite

esencial de Limón al 100 % inhibió en promedio al Streptococcus Mutans en 9.333 mm y el aceite esencial de naranja al 100 % inhibió en promedio al Streptococcus Mutans en 14. 667, mostrando diferencias en el tamaño de los halos de inhibición.

TABLA 2: Efectividad antibacteriana de los aceites esenciales de Hinojo, Hierba Luisa, Orégano, Limón y Naranja, con el del gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre cepas estandarizadas de Streptococcus Mutans.

SUSTANCIAS ANTIBACTERIANAS	HALOS DE INHIBICIÓN BACTERIANA (MM)			
	Resistente	Sensible limite	Sensible medio	Súper sensible
	Media	Media	Media	Media
GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12%			14,000	
ACEITE DE HINOJO			15,000	
ACEITE DE HIERBA LUISA				33,833
ACEITE DE OREGANO			16,270	
ACEITE DE LIMON	9,333			
ACEITE DE NARANJA			14,889	.

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

TABLA N° 2: Al realizar la evaluación de la efectividad antibacteriana se observó que el aceite que mejor efecto antibacteriano tuvo fue el de Hierba Luisa con un diámetro de 33.8 mm considerándose como súper sensible sobre el crecimiento de las cepas de Streptococcus Mutans, a diferencia del aceite esencial de limón que presento resistencia con un diámetro de 9 mm al crecimiento de las cepas de Streptococcus Mutans, considerándolo como el aceite que menor inhibición bacteriana tuvo. Los aceites esenciales de orégano, hinojo y naranja junto al patrón de control tuvieron un efecto antibacteriano similar con un diámetro entre 14 mm a 16 mm sobre el crecimiento de las cepas de Streptococcus Mutans.



TABLA N° 3: Halo de inhibición del aceite esencial de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo).

ANTIBACTERIANO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR	HALO MÍNIMO	HALO MÁXIMO
ACEITE ESENCIAL DE FOENICULUM VULGARE (HINOJO).	6	15.000 mm	0.8944 mm	0.3651mm	13.0 mm	17.00 mm

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

TABLA N° 3: se observa la medida del halo mínimo que es 13 mm y un halo máximo de 17 mm de inhibición antibacteriana formados por el aceite esencial de Hinojo sobre el crecimiento de las cepas de *Streptococcus Mutans* mostrando una media total de 15.00 mm de formación de halo, considerándose el 3^{er} aceite que mayor efectividad antibacteriana posee.



TABLA N° 4: Halo de inhibición del aceite esencial de Cimboogon citrus (Hierba Luisa).

ANTIBACTERIANO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR	HALO MÍNIMO	HALO MÁXIMO
ACEITE ESENCIAL DE CIMBOGON CITRUS (HIERBA LUISA).	9	33.833	6.5391	2.1797	27.5 mm	48.00 mm

FUENTE: Ficha de recolección de datos

TABLA N° 4: Se observa la medida del halo mínimo que es 27.5 mm y un halo máximo de 48 mm de inhibición antibacteriana formados por el aceite esencial de Hierba Luisa sobre el crecimiento de las cepas de Streptococcus Mutans mostrando una media total de 33.8 mm de formación de halo, considerándose el 1^{er} y mejor aceite que mayor efectividad antibacteriana posee.



TABLA N° 5 Halo de inhibición del aceite esencial de Origanum Vulgare (Orégano)

ANTIBACTERIANO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR	HALO MÍNIMO	HALO MÁXIMO
ACEITEESENCIAL DE ORIGANUM VULGARE (ORÉGANO)	9	17.556	3.6553	1.4153	14.00 mm	27.00 mm

FUENTE: Ficha de recolección de datos

TABLA N° 5:se observa la medida del halo mínimo que es 14 mm y un halo máximo de 27 mm de inhibición antibacteriana formados por el aceite esencial de Orégano sobre el crecimiento de las cepas de Streptococcus Mutans mostrando una media total de 17.5 mm de formación de halo, considerándose el 2^{do} aceite que mayor efectividad antibacteriana posee.

**TABLA N° 6** Halo de inhibición del aceite esencial de Citrus aurantifolia swingle (Limón)

ANTIBACTERIANO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR	HALO MÍNIMO	HALO MÁXIMO
ACEITE ESENCIAL DE CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE (LIMÓN)	6	9.333	3.7238	1.5202	5 mm	16 mm

FUENTE: Ficha de recolección de datos.

TABLA N°6: Se observa la medida del halo mínimo que es 5 mm y un halo máximo de 16 mm de inhibición antibacteriana formados por el aceite esencial de Limón sobre el crecimiento de las cepas de Streptococcus Mutans mostrando una media total de 9 mm de formación de halo, considerándose el aceite que mostro resistencia antibacteriana sobre las cepas de Streptococcus Mutans.

**TABLA N° 7** Halo de inhibición del aceite esencial de Citrus sinensis (Naranja)

ANTIBACTERIANO	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA	ERROR	HALO MÍNIMO	HALO MÁXIMO
ACEITE ESENCIAL DE CITRUS SINENSIS (NARANJA)	9	14.889 mm	1.0000 mm	0.333 mm	14 mm	17 mm

FUENTE: Ficha de recolección de datos

TABLA N° 7: Se observa la medida del halo mínimo que es 14 mm y un halo máximo de 17 mm de inhibición antibacteriana formados por el aceite esencial de naranja sobre el crecimiento de las cepas de *Streptococcus Mutans* mostrando una media total de 14.8 mm de formación de halo, considerándose el 4^{to} aceite que presenta efectividad antibacteriana.

TABLA N° 8 Comparación de los halos de inhibición de los aceites esenciales de: Hinojo, Hierba Luisa, Orégano, Limón y Naranja con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% a las 24, 48 y 72 horas.

A LAS 24 HORAS					
ACEITES ESENCIALES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
ACEITE DE LIMÓN	6	9.333			
GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12%	3		12.667		
ACEITE DE NARANJA	9			14.667	
ACEITE DE HINOJO	6			15.000	
ACEITE DE ORÉGANO	9			15.889	
ACEITE DE HIERBA LUISA	9				32.967
A LAS 48 HORAS					
ACEITES ESENCIALES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
ACEITE DE LIMÓN	6	9.333			
GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12%	3		14.000		
ACEITE DE NARANJA	9			14.889	
ACEITE DE HINOJO	6			15.000	
ACEITE DE ORÉGANO	9			16.889	
ACEITE DE HIERBA LUISA	9				33.833
A LAS 72 HORAS					
ACEITES ESENCIALES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
ACEITE DE LIMÓN	6	10.333			
GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0.12%	3		14.000		
ACEITE DE NARANJA	9			14.889	
ACEITE DE HINOJO	6			15.167	
ACEITE DE ORÉGANO	9			17.556	
ACEITE DE HIERBA LUISA	9				33.833



TABLA N°8: La prueba de HSD de TUKEY clasifica la inhibición de *Streptococcus Mutans* en cuatro subconjuntos lo cual indica que a diferentes horas pero a la misma concentración los aceites esenciales de Hinojo, Hierba Luisa, Orégano, Limón y Naranja reaccionan de manera diferente obteniendo un mejor halo de inhibición a las 72 horas. Al realizar las comparaciones pareadas según la prueba de HSD de TUKEY se observa que en el subconjunto 1 la inhibición de *Streptococcus Mutans* es menor con el aceite esencial de Limón a las 24, 48 y 72 horas no teniendo efectividad antibacteriana. En el subconjunto 3 se muestra que los aceites esenciales de Orégano, Hinojo y Naranja tuvieron efectividad antibacteriana con una variación mínima de diámetro en la formación de halos de inhibición a las 24, 48 y 72 horas, mientras que el aceite esencial de Hierba Luisa como subconjunto independiente mostro su efectividad antibacteriana desde las 24 horas donde presenta el mayor halo de inhibición sobre el crecimiento de *Streptococcus Mutans* a diferencia de los demás aceites estudiados.



CAPITULO V

DISCUSIÓN

En el presente estudio de tipo experimental in vitro se buscó determinar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimnopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *citrus aurantifolia swingle* (Limón) y *citrus sinesis* (Naranja), al 100 % comparado con el efecto antibacteriano del Gluconato de Clorhexidina al 0.12% frente a cepas estandarizadas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175.

El tamaño de la muestra para el presente trabajo estuvo constituida por 17 cajas Petri inoculadas con las cepas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 , 3 cajas Petri correspondientes para cada aceite esencial con 3 pads , y 2 cajas Petri para el patrón control con 3 pads . Por lo cual, el muestreo es no probabilístico por conveniencia.

Aun no se refieren estudios sobre la efectividad antibacteriana del *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), frente a microorganismos patógenos pero si estudios fármaco-químicos donde se demuestra que esta especie vegetal presenta los denominados compuestos fenólicos que le da las propiedades antibacterianas , en nuestro estudio se ha demostrado que aceite esencial de Hinojo presenta propiedades antibacterianas ya que generó halos de inhibición frente a la cepa de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 (Gram +) y mayor al de los halos que generó el Gluconato de Clorhexidina al 0.12%.

Los aceites esenciales de *Cimnopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *citrus aurantifolia swingle* (Limón) y *citrus sinesis* (Naranja), tienen en su composición un principio activo de compuestos fenólicos los cuales les da las propiedades antibacterianas, estos han sido estudiados y evaluados frente a microorganismos patógenos Gram (+) y Gram (-), demostrando su alto valor antibacteriano, otros estudios indican que además de tener propiedades



antibacterianas el orégano posee propiedades antifúngicas debido a que presenta en su composición a los principios activos de timol y carvacrol.

Existen estudios como el de:

Rojas et al. Que evaluaron la actividad anti *Trypanosoma cruzi* in vitro de los aceites esenciales de 10 plantas medicinales, entre ellas considerándose para el presente estudio solo el de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), concluyendo que el aceite esencial de Hierba Luisa mostró actividad anti-*Trypanosoma cruzi* antibacteriana frente a patógenos Gram (+) y Gram (-), y no fueron citotóxicas para las células mamíferas. En nuestro estudio existe concordancia con el efecto antibacteriano del aceite esencial de Hierba Luisa esto porque los principios activos como los fenoles tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de las cepas de *Streptococcus Mutans*.

Otro estudios dados por **Alzamora et al.** Demostró que las propiedades antibacterianas de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), sobre bacterias GRAM (+) y GRAM (-) ejerció mayor efecto antibacteriano con un halo de 36 mm mas no en la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*. En nuestro estudio realizado también se demostró que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) posee propiedades antibacterianas sobre la cepa de *Streptococcus Mutans* con un halo de 33.8 mm, esta variación de diámetro en la formación de los halos fue porque Alzamora obtuvo su aceite esencial a partir de materia prima fresca, tuvo otras condiciones ambientales, utilizó 5ml de aceite esencial sobre los patógenos, además de no haber utilizado específicamente a la bacteria *Streptococcus Mutans*, a diferencia de nuestro estudio donde la materia prima fue secada a temperatura ambiente, y utilizamos 10 ul de nuestro aceite esencial donde demostró tener un efecto antibacteriano mucho más efectiva que nuestro patrón control.

En otro estudio realizado por **Albado et al.** Demostraron que el aceite esencial de *Origanum Vulgare* (Orégano), En cuanto a su actividad antimicrobiana, el resultado de la investigación confirma que el aceite esencial del orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus*



aureus y *Bacillus cereus* con un halo de inhibición de 14 mm y sobre bacterias Gram negativas con un halo de 18 mm, pero la bacteria *Pseudomona auriginosa* no mostró sensibilidad frente al aceite esencial. En nuestro estudio demostramos también que el aceite esencial de *Origanum Vulgare* (Orégano) tiene propiedades antibacterianas porque al ser expuesto frente a la cepa Gram (+) *Streptococcus Mutans* generó halos de inhibición de 17.5 mm mostrando tener un efecto mayor que el del gluconato de clorhexidina al 0.12%. El halo obtenido en nuestro es mayor al de Albado porque el tiempo de destilación del aceite fue de 90 minutos haciendo que exista mayor concentración de los componentes del aceite esencial de orégano.

Picón et al. Realizo un estudio sobre las propiedades antimicrobianas de tres subproductos cítricos; mandarina, naranja y limón, frente a dos patógenos de especial interés para la industria agroalimentaria, concluyendo que los subproductos cítricos presentan capacidad antimicrobiana efectiva, pudiendo actuar como barrera a la proliferación microbiana. En nuestro estudio se demostró que el aceite de *Citrus Sinesis* (Naranja) también tiene propiedades antibacterianas ya que presento halos de inhibición de igual diámetro que el Gluconato de Clorhexidina, mas no el aceite esencial de *citrus aurantifolia swingle* (Limón) ya que este presento halos de inhibición menores que el Gluconato de Clorhexidina no demostrándose su efectividad antibacteriana en comparación al patrón control, esto debido a que en el estudio realizado por Picón se obtuvieron los aceites esenciales por disolución de los polvos de naranja y limón, lo que no ocurrió en nuestro procedimiento ya que la destilación fue a partir de las cascaras desecadas de naranja y limón.

Guerra et al. realizó un estudio sobre Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) frente a microorganismos Gram(+) y Gram (-) demostrando que tiene efecto antibacteriano a diferentes concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50, 60,70,80 ,90 y 100% con un halo entre 8 mm a 10 mm. En nuestro estudio demostramos que a una concentración al 100 % tenemos un halo



de 14.8 mm, esto lo atribuimos al tipo de naranja y que específicamente no utilizó la bacteria *Streptococcus Mutans*.

En comparación de los aceites esenciales de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *citrus sinesis* (Naranja), presentaron en la concentración al 100% los mejores resultados sobre las cepas de *Streptococcus Mutans*, esta acción se contribuye al Citral, Carvacrol, Linalool y Geraniol dándoles sus propiedades antibacterianas, el aceite de *citrus aurantifolia swingle* (Limón) a pesar de poseer en su composición el Citral no tuvo mayor efecto antibacteriano esto lo atribuimos al método de extracción de su aceite esencial que no solo es por destilación por arrastre a vapor sino por métodos químicos que no se utilizó en este estudio ya que el enfoque fue de método natural.

Para este estudio utilizamos como patrón control al Gluconato de Clorhexidina el cual formó halos de inhibición entre 12 -14 mm de diámetro para tomar como referencia y determinar el efecto antibacteriano de nuestros 5 aceites esenciales estudiados. Asimismo, referimos que los experimentos *in vitro* tienen sus limitaciones en cuanto a la posible eficacia *in vivo*, los resultados de este estudio merecen atención respecto al efecto citotóxico de dichos aceites esenciales. Por lo tanto, se propone realizar futuras investigaciones para evaluar posibles efectos citotóxicos del aceite esencial de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia swingle* (Limón), *Citrus sinesis* (Naranja), y a la vez, se sugiere hallar una concentración mínima inhibitoria ideal para cada aceite esencial estudiado.

Con respecto a la efectividad antibacteriana que tienen los aceites esenciales de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Cimbopogon citrus* (Hierba Luisa), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus aurantifolia swingle* (Limón), *Citrus sinesis* (Naranja), para determinar si es resistente o sensible se tomaron en cuenta las pautas dadas por Duraffourd y Lapraz, considerándose 4 subgrupos tales como: Resistente, Sensible limite, Sensible medio y Súper sensible, donde se estableció que el



aceite esencial de *Citrus aurantifolia* Swingle (Limón) es considerado como resistente, los aceites esenciales de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *Origanum Vulgare* (Orégano), *Citrus sinensis* (Naranja) incluido el patrón control son considerados como sensibles medio, el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) se consideró como súper sensible siendo el aceite que mayor efectividad antibacteriana posee.



CONCLUSIONES

1. Se determinó el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo) *Cimbopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum Vulgare* (orégano), *citrus aurantifolia swingle* (limón), *citrus sinesis* (naranja), los cuales demostraron su efecto en el siguiente orden de mayor a menor halo de inhibición : *Cimbopogon citrus* (hierba luisa), *Origanum Vulgare* (orégano), *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *citrus sinesis* (naranja), *citrus aurantifolia swingle* (limón), mismos que representan una buena alternativa para evitar el uso de productos sintéticos en el control de las cepas de *Streptococcus Mutans*.
2. Se midió el halo inhibitorio generado por el aceite esencial de *Foeniculum Vulgare* (Hinojo) al 100 % habiendo observado que le corresponde un halo de 15 mm de diámetro sobre las cepas de *Streptococcus*.
3. Se midió el halo inhibitorio generado por el aceite esencial de *Origanum Vulgare* (orégano) al 100 % habiendo observado que le corresponde un halo de 17 mm de diámetro sobre las cepas de *Streptococcus*.
4. Se midió el halo inhibitorio que genero el aceite de *Cimbopogon citrus* (hierba luisa) al 100 % habiendo observado que le corresponde un halo de 33.8 mm de diámetro sobre las cepas de *Streptococcus Mutans*.
5. Se midió el halo inhibitorio que genero el aceite de *citrus aurantifolia swingle* (limón) al 100 % habiendo observado que le corresponde un halo de 9.33 mm de diámetro sobre las cepas de *Streptococcus Mutans*.
6. Se midió el halo inhibitorio que género el aceite de *citrus sinesis* (naranja), al 100 % habiendo observado que le corresponde un halo de 14. 8 mm de diámetro sobre las cepas de *Streptococcus Mutans*.
7. Se compararon los diámetros de los halos de inhibición de los 5 aceites esenciales al 100 % con el Gluconato de Clorhexidina al 0.12% durante las 24, 48 y 72 se determinó que existe diferencias mayores en los diámetros de halos de inhibición considerándose al aceite esencial de *Cimbopogon citrus* (hierba luisa) como mejor antibacteriano seguida de los aceites esenciales de *Origanum Vulgare* (orégano), *Foeniculum Vulgare* (Hinojo), *citrus sinesis*



(Naranja) en comparación al efecto antibacteriano del Gluconato de clorhexidina mas no así el aceite esencial de Citrus aurantifolia swingle (Limón) al 100 % siendo este el que no demostró efectividad antibacteriana frente a las cepas de Streptococcus Mutans.



RECOMENDACIONES

Se recomienda:

1. Realizar estudios de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Origanum vulgare* (Orégano), *Foeniculum vulgare* (Hinojo), *Citrus sinensis* (Naranja), *Citrus aurantifolia* Swingle (Limón), frente a otras bacterias de interés odontológico.
2. Comparar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Origanum vulgare* (Orégano), *Foeniculum vulgare* (Hinojo), *Citrus sinensis* (Naranja), *Citrus aurantifolia* Swingle (Limón), frente a diferentes fármacos utilizados en odontología.
3. Realizar más estudios sobre la posibilidad de acción sinérgica entre los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (Orégano), *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Foeniculum vulgare* (Hinojo), *Citrus sinensis* (Naranja), así como su posible toxicidad en el ser humano a concentraciones muy elevadas.
4. Realizar estudios químicos farmacéuticos de dichos aceites para la elaboración de medicamentos anticariógenos como colutorios, pastas dentales, etc, además determinar el principal principio activo que da las propiedades antibacterianas mediante la cromatografía de cada aceite esencial estudiado.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. MATUTE M., Evaluación in vitro del extracto de piper angustifolium (matico) y la clorhexidina como antisépticos bucales, [Tesis], Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, 2009, pág. 2-3.
2. Henostroza, G. Caries Dental: Principios y Procedimientos para el Diagnóstico. (1 ed.). Médica Ripano. Madrid (2007).
3. COSCO D., Actividad inhibitoria del crecimiento de Streptococcus mutans y de flora mixta salival por acción del aceite esencial de la Matricaria chamomilla manzanilla", [Tesis], Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, 2010, pág. 3-9.
4. Torres, M. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en; la estomatología. Gaceta Médica Espirituana, (2009). Pág. 1-11.
5. IBARRA P, "Estudio IN VITRO del aceite esencial de Eucalyptus globulus L, en comparación al Hipoclorito de sodio al 2,5 % y gluconato de clorhexidina al 2% sobre cepas de Enterococcus faecalis". [TESIS], Universidad Central de Ecuador, 2014, pag 4.
6. IGUARÁN I, "Factores biológicos asociados a la caries dental", [Tesis], Universidad de Guayaquil, Julio 2012, pag. 7-14.
7. OJEDA J, OVIEDO E, SALAS L, "Streptococcus Mutans y caries dental", Colombia; [REV] VOL 26 (1), Junio 2013, pag 46-48
8. OMS, "Estrategia sobre medicina tradicional 2000-2005", Ginebra, Disponible:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/67314/1/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf.
9. FERREIRA F, et al. "Utilización de sustancias naturales en odontología." AGOSTO 2015, VOL 1(1).
10. GUERRA M, RODRÍGUEZ M, GARCÍA G, LLERENA C, Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de Cymbopogon citratus (DC). Stapf, Ciudad de la Habana Mayo-ago. 2004; Rev Cubana Plant Med v.9 (2)
11. PICÓN E, RODRIGO M, MARTÍNEZ A, PINA M, España, Junio (2013), Evaluar las propiedades antimicrobianas de tres subproductos cítricos;



- mandarina, naranja y limón, frente a dos patógenos de especial interés para la industria agroalimentaria *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7, universidad Politécnica de Valencia, España, Junio 2013.
12. GUERRA L, SOTO L, MEDINA Z, OJEDA G. Y PEÑA J, Venezuela – Carabobo (2014), Actividad antibacteriana del aceite esencial de cortezas de naranja (*Citrus sinensis*) var. Valencia frente a microorganismos gram positivos y gram negativos, Venezuela, Rev. Fac. Agron. 2014, 31: 215-232
 13. ALBADO E, SAEZ G, GRABIEL S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Lima – Perú ; Rev Med Hered 12 (1), 2001
 14. ALZAMORA L, MORALES L, ARMAS L, FERNÁNDEZ G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana IN VITRO de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas, Lima- Perú , Rev v.62(12):2001:156-161.
 15. ROJAS J, SOLIS H, PALACIOS O, Lima- Perú (2010), Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales; Lima, An Fac med. 2010;71(3):161-5
 16. BRUNETON, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A pag 20
 17. THOMPSON W. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. 1ª Edición. Barcelona: Editorial Blume; 1981: 119.
 18. ANDERSON P, Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida, 2009, ED. Elizcom, Colombia; pag 89
 19. Van Ginkel, A. (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.” Disponible en : <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema7.pdf>
 20. MARTINEZ A., Profesor, Facultad Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, “ACEITES ESENCIALES”, Medellín, Colombia, Febrero 2003:pag. 1-2, 5-18.



21. STASHENKO E., Universidad Industrial de Santander, Aceites Esenciales, Colombia, 1ra Ed. Octubre 2009; pag 29 Disponible en : http://cenivam.uis.edu.co/cenivamnew/sites/default/files/Aceites%20Esenciales_0.pdf
22. BRUNETON, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A. pag 40
23. Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health/ November 2007, Volume 2, Issue 4, pp 399-406 /First online: 18 November 2007 / H. M. Rawel - S. E. Kulling.
24. REYES J, PALOU E., LOPEZ M, Universidad de las Américas de Puebla, Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes de los aceites esenciales; México, 2014; pag 68-69
25. CANO C, Universidad Nacional DE San Marcos, Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Mitostachys Mollis* “muña”, [TESIS], LIMA- PERU, 2007; PAG 11
26. LAWRENCE B, the antimicrobial –biological activity of essential oils. Allured publishing corp. Carol Stream, IL, 2005, 504 p.
27. ALIAGA P, “Evaluación de la actividad antibacteriana IN VITRO del aceite esencial de hojas de *Alosietriphylla P. (cedrón)* frente a *Escherichiacoli* y *Staphylococcosaereus.*, [TESIS], Universidad Nacional Jorge Basadre Grohman, Tacna (2013), pag 27.
28. PEREDO L, PALOU G, LOPEZ M, “Aceites esenciales : métodos de extracción”, Universidad de las Américas, Mexico;2009, VOL3(1),pag 27
29. MENDOZA D, TABORDA ML, composición química y actividad acaricida del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* contra el acaro intradomiciliario *Dermatophagoidesfarinae* (Acari: Pyroglyphidae), 2010, Julio – Diciembre VOL 9(2)
30. SANTOS A. “Evaluación del rendimiento de aceite esencial de hinojo (*Foeniculum Vulgare* Miller) procedente de dos niveles altitudinales de Guatemala *Origanum Vulgare*” [TESIS]Guatemala, Abril 2006; pag 19



31. GUERRERO L. Y NÚÑEZ MJ. "Obtención de Aceites Esenciales de Eucalipto y Orégano" Industria Farmacéutica [TESIS] 1991; Julio-Agosto, pag, 73-79.
32. GMITTER, F.G. y X. HU, "The possible role of Yunnan, in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae)". Economy Botan; China 1990: (44):267-277.
33. CHOME F, "La variedad de los cítricos", [REV], España, 2011; VOL 1(1), pag 23-25
34. BEÑATENA, H. N. 1972. Clasificación Botánica de los Citrus Cultivados. [REV] EEA INTA Concordia, E.R., Argentina. VOL(1)
35. JUÁREZ J, CASTRO A., JAÚREGUI J. "Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de citrus sinensis l. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica"; Ciencia e Investigación: Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM 2010 VOL13 (1): 9-13.
36. CASTRO V, "Inhibición del crecimiento in vitro de Streptococcus Mutans por papaína y sanitred", (TESIS DOCTORAL), Universidad de Chile, Santiago, 2005.
37. LIEBANA J. MICROBIOLOGIA ORAL 2da Edición Madrid España, Mc Graw Hill, 2002, pág. 348-367.
38. ALARCON P, "Diagnostico microbiológico del genero Streptococcus", Instituto de Salud Pública, mayo, 2011, Chile.
39. BARRANCOS M., Operatoria dental, 4ta ed., editorial Panamericana, Argentina; 2006: pag.300.
40. MCGHEE JR, MICHALEK SM, CASELL GH, 1982. Dental microbiology, 1 Ed, Harper and Row Publishers, Philadelphia, USA, pag 900.
41. VILAFRANCA F, ALFONSO N, et al, "Higienistas dentales", los autores, editorial Mad, S.L. 1º EDICION, JUNIO 2006, España
42. MELCHORA F, LISSERA R, BATELLINO L, Película adquirida saliva: Revisión de literatura, Acta odontológica venezolana, 45(3), 2007, Venezuela. Disponible:



- http://www.actaodontologica.com/ediciones/2007/3/pelicula_adquirida_saliv_al.asp
43. ZANATTA F., ANTONIAZZI R., RÖSING K. The effect of 0.12% Chlorhexidine Gluconate Rinsing on previously plaque-free and plaque covered Surfaces: A randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* (2007) (78):2127-2134.
44. BASCONES, A. (1994) Clorhexidina en Odontoestomatología, Conceptos actuales y revisión de la literatura. *Avances en Odontoestomatología*, 10,10, 685-708.
45. ARRAIZA P, Principios Activos en plantas medicinales y aromáticas, UIAPAM, 2008, Madrid, Unidad N°4, pág. 2.
46. MARTINEZ M, Aceites esenciales, Facultad de química farmacéutica, 2003, Medellín, pag 1-3
47. PORRAS L, LOPEZ M, Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos, México, Temas selectos de Ingeniería de Alimentos 3-1 (2009): 121 -134. Disponible en : [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Porras-Loaiza-et-al-2009.pdf)
48. WhoInt [Internet]. España, WhoInt;2016[actualizado abril 2015; citado 2016] Disponible en : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
49. ALTAMIRA V, Cultivo y aislamiento de bacterias, [Internet], [Actualizado 2010; citado 2010]. Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/cultivo-y-aislamiento-bacterias/cultivo-y-aislamiento-bacterias.pdf>
50. NCCLS CHANGES NAME TO CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, United States, Volume 15, No.1, 2005 Disponible en: http://www.bd.com/vacutainer/labnotes/Volume15Number1/nccls_changes_to_clsi.asp



ANEXOS

ANEXO 1

FICHA PARA RESULTADOS DE EVALUACION DE EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA

TIEMPO DE LECTURA	N° PAD	PATRON CONTROL	ACEITES ESENCIALES																					
			0	1			PROM	2			PROM	3			PROM	4			PROM	5			PROM	
			M	1M	2M	3M		M	M	M		M	M	M		M	M	M		M	M	M		
24 HRS	1°PAD																							
	2°PAD																							
	3°PAD																							
48 HRS	1° PAD																							
	2°PAD																							
	3°PAD																							
72 HRS	1°PAD																							
	2° PAD																							
	3° PAD																							



ANEXO N° 2

SOLICITUD PRESENTADA AL LABORATORIO

Cusco, 29 de Enero del 2016

Ing. Mario Cumpa Cayuri

CONSULTOR AMBIENTAL DREM-GR-CUSCO

SOLICITA: CAPACITACION Y
AUTORIZACION DE USO DEL
LABORATORIO MC QUIMICA LAB.

Previo un cordial saludo; mediante el presente nos es muy grato dirigirnos a usted las internas en Estomatología: Liseth Karina Baca Zans y Adriana Yábar Fluker; para solicitarle la capacitación y autorización de uso de laboratorio, para desarrollar nuestro proyecto de tesis titulada efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: foeniculum vulgare (hinojo), cimbopogon citrus (hierba luisa), organum vulgare (oregano), citrus aurantifolia swingle (limon) y citrus sinensis (naranja), frente a cepas estandarizadas de streptococcus mutans, cusco 2016. Por lo que le solicitamos se nos conceda la autorización para los meses de Febrero y Marzo.

Sin otro en particular y agradeciendo por la atención que el presente merezca, aprovechamos la oportunidad de reiterarle la muestra de nuestra estima personal.

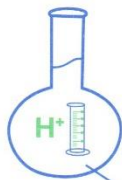
ATENTAMENTE

Liseth Karina Baca Zans

Interna de Estomatología

Adriana Yábar Fluker

Interna de Estomatología



MC QUIMICALAB

De: Ing. Mario Cumpa Cayuri

LABORATORIO DE CIENCIAS NATURALES:
AGUAS, SUELOS, MINERALES Y MEDIO AMBIENTE

RUC N° 102384090787 - TELÉF. 271966 COVIDUC A4 - CEL 984687752

CONSTANCIA DE SERVICIO

Por la presente el Laboratorio Químico MC QUIMICA LAB, hace constar que durante los meses de Febrero a Marzo se ha realizado la destilación por arrastre a vapor de los aceites esenciales de: Hierba Luisa, Orégano, Hinojo, Limón y Naranja. Por lo cual se expide la presente constancia a petición verbal de las solicitantes:

Tesistas de la UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO, FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA

- Liseth Karina Baca Zans Código 009200622H
- Adriana Yábar Fluker Código 009200657F

El trabajo de destilación se ha realizado para la tesis titulada:

“ EFECTO ANTIBACTERIANI INVITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE: FOENICULUM VULGARE (HINOJO), CIMBOPOGON CITRUS (HIERBA LUISA) , ORIGANUM VULGARE (OREGANO) , CITRUS AURATIFOLIA SWINGLE (LIMOM) Y CITRUS SINESIS (NARANJA), FRENTE A CEPAS ESTANDARIZADAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS, CUSCO 2016.”

CUSCO, 31 DE MARZO DEL 2016



Ing. Mario Cumpa Cayuri
Reg. CIP. 15188
CONSULTOR AMBIENTAL DREM-GR-CUSCO
CATEGORIA I Y II



ANEXO N° 3

SOLICITUD PRESENTADA AL LABORATORIO

Cusco, de 31 de Marzo del 2016
Blgo. María del Carmen Yáñez Mujica
Biólogo

SOLICITA: CAPACITACION Y
AUTORIZACION DE USO DEL
LABORATORIO SERVISALUD

Previo un cordial saludo; mediante el presente nos es muy grato dirigirnos a usted las egresadas en Estomatología: Liseth Karina Baca Zans y Adriana Yábar Fluker; para solicitarle la capacitación y autorización de uso de laboratorio, para desarrollar nuestro proyecto de tesis titulada efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: Foeniculum Vulgare (hinojo), Cimbopogon citrus (hierba luisa), Origanum Vulgare (orégano), citrus aurantifolia swingle (limón) y citrus sinesis (naranja), frente a cepas estandarizadas de Streptococcus Mutans, cusco 2016. Por lo que le solicitamos se nos conceda la autorización para los meses de Abril – Mayo.

Sin otro en particular y agradeciendo por la atención que el presente merezca, aprovechamos la oportunidad de reiterarle la muestra de nuestra estima personal.

ATENTAMENTE

Liseth Karina Baca Zans
Interna de estomatología

Adriana Yábar Fluker
interna de odontología



CONSTANCIA DE SERVICIO DEL LABORATORIO CLINICO SERVISALUD

Por la presente el Laboratorio Clínico SERVISALUD, hace constar que en la fecha de los meses de abril – mayo, se han realizado en nuestra Área de Microbiología el Análisis de sensibilidad antimicrobiana de los aceites esenciales de Yerba Luisa, Orégano, Hinojo, Limón y Naranja a Estreptococos mutans.

Habiéndose tenido una Prueba Piloto los días 6,7 y 8 de Abril del 2016, cuyos resultados se adjuntan en el presente informe.

Los días 26, 27 y 28 de Abril se realizó la Prueba de sensibilidad antimicrobiana de los citados aceites esenciales con la cepa liofilizada de Estreptococos mutans (ATCC25175), cuyos resultados se adjuntan al presente Informe.

Se expende la presente constancia a petición de las solicitantes

- Liseth Karina Baca Zans Código 009200657-H
- Adriana Yábar Fluker Código 009200657-F

UNIVERSIDAD ANDINA DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA

TESIS:

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE: FOENICULUM VULGARE (HINOJO), CIMBOPOGON CITRUS (HIERBA LUISA), ORIGANUM VULGARE (OREGANO), CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE (LIMON) Y CITRUS SINESIS (NARANJA), FRENTE A CEPAS ESTANDARIZADAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS, CUSCO 2016.

Cusco, 06 de Junio del 2016


María Del Carmen Yáñez Mujica
BIÓLOGO
C.B.P 8298

2



Av. Tomasa Tito Condemayta N° 844 251 288
Av. de la Cultura 1214, 2º Piso, Of. 202 232 454
Av. de la Cultura 1302, 2º Piso, Of. 206 232 992
info@laboratorioservisalud.com

ANEXO N° 4

PROCEDIMIENTOS QUIMICOS

RECOLECCION Y SECADO DE 2 KG DE LAS ESPECIES: HINOJO, HIERBA LUISA, ORÉGANO, LIMÓN Y NARANJA EN EL MERCADO DE SAN PEDRO DE LA CIUDAD DEL CUSCO.



**EXTRACCION DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL METODO
DESTILACION POR ARRASTE A VAPOR**

VERIFICACION DE CORRECTO ARMADO DEL EQUIPO DE DESTILACION

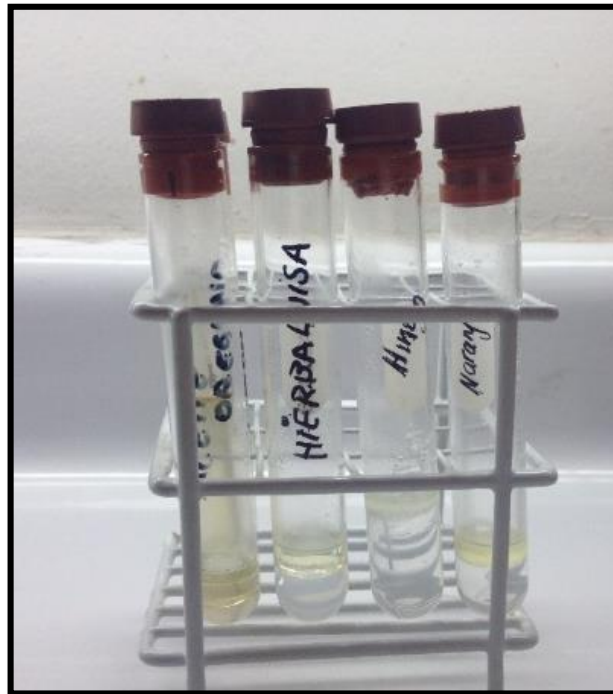


POSTERIORMENTE SE COLOCÓ EN EL CONTENEDOR METÁLICO 1LT.DE AGUA Y 2KG DE LA MATERIA PRIMA (HIERBA LUISA, ORÉGANO, HINOJO, NARANJA Y LIMÓN), LA MUESTRA FUE SOMETIDA (DURANTE 90 MIN.)





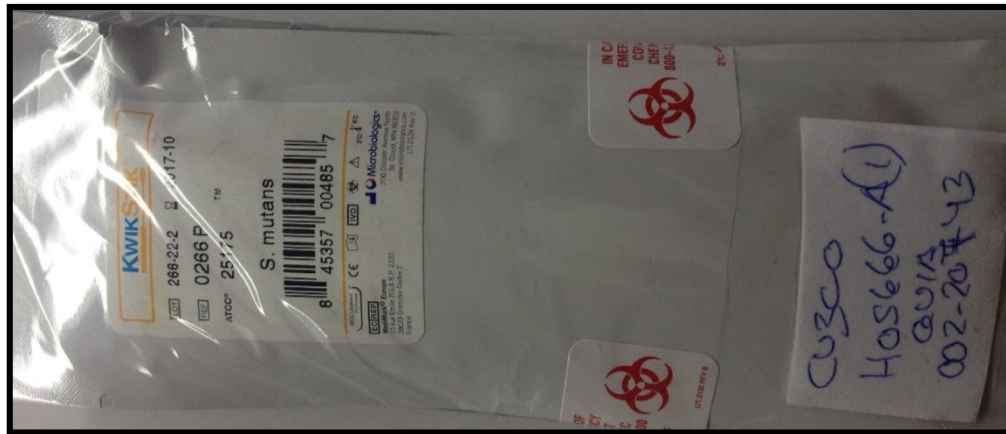
RECOLECCION DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LOS TUBOS DE ENSAYO



ANEXO N° 5

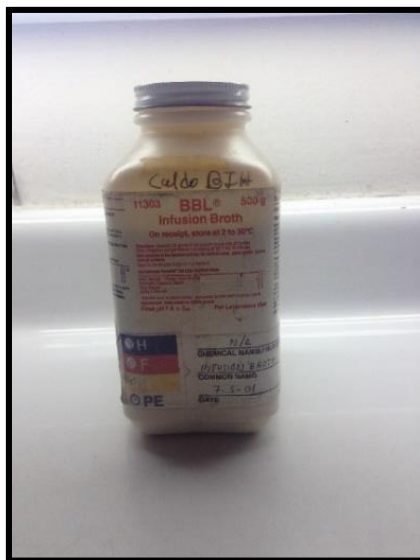
PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

LAS CEPAS BACTERIANAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175 FUERON OBTENIDAS DEL LABORATORIO DE REFERENCIA GEN LAB DEL PERÚ S.A.C.



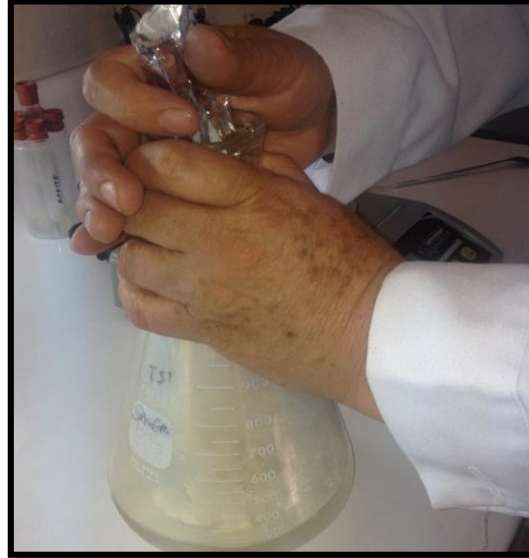
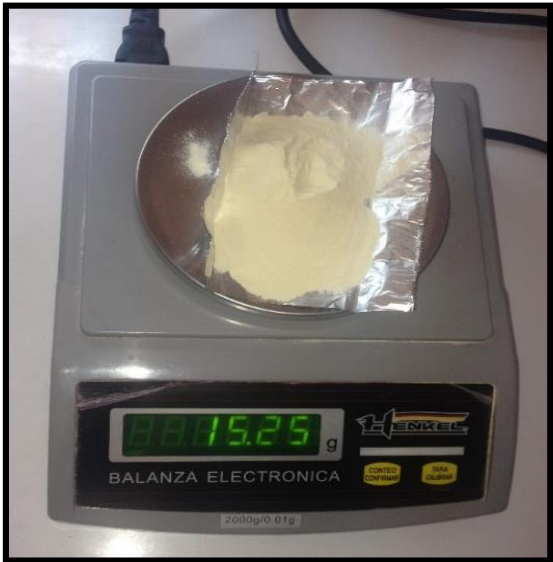
ACTIVACION DE CEPAS

SE UTILIZO CALDO CEREBRO – CORAZÓN INFUSIÓN (BHI), SE DEJÓ INCUBAR POR 24 HORAS A 36.7 °C.

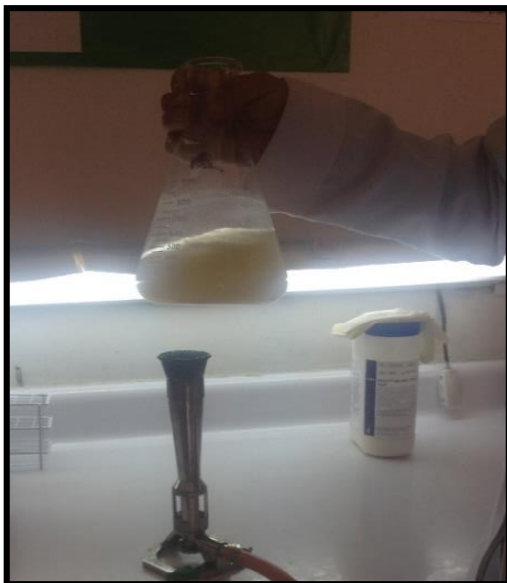


PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

En una balanza analítica pesamos 15,2 gr de agar deshidratado, luego lo echamos a un matraz adicionando 400 ml de agua destilada.



Se llevó a fuego lento agitando hasta disolver el polvo, se dejó entibiar y agregamos 2% de sangre humana luego tapamos la boquilla del matraz con papel aluminio y lo llevamos a la autoclave por 15 min a 121 °C.

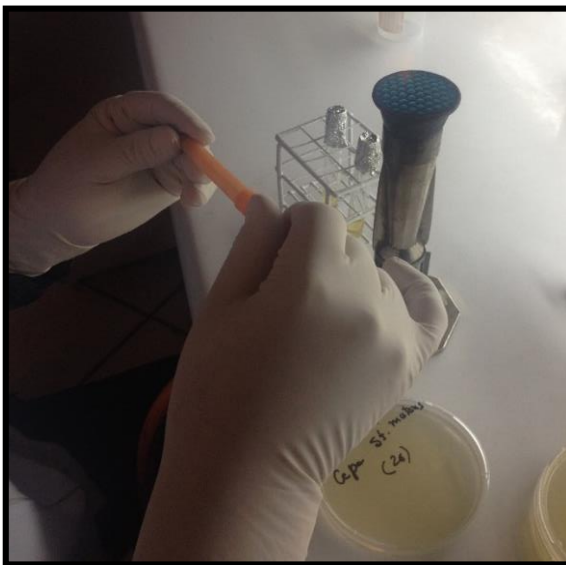


Distribuimos el Agar en las cajas Petri y las llevamos a la autoclave por 24 horas como control para evitar colonización de otras bacterias del medio ambiente.

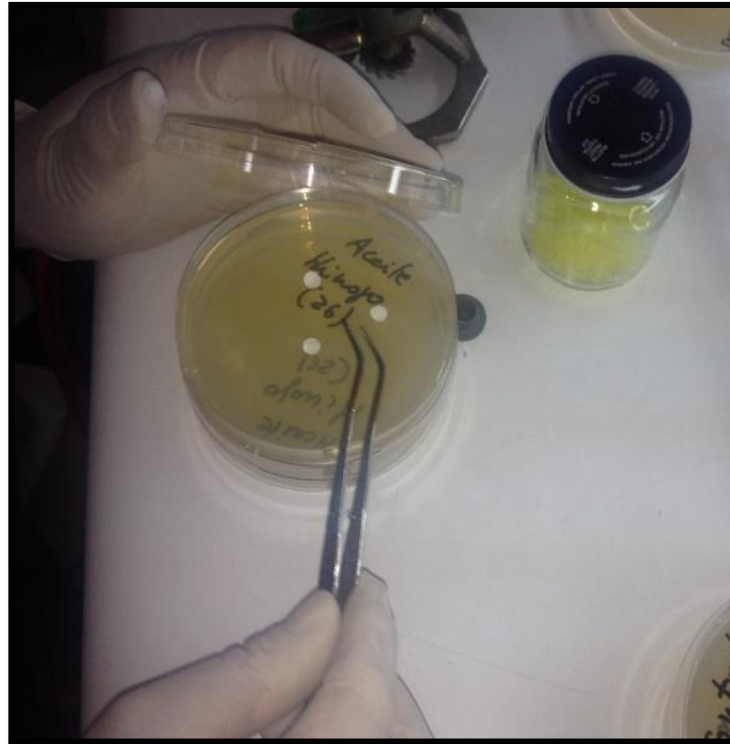


DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA POR EL METODO DE DISCO-DIFUSION

INOCULACION DE PLACAS



DISPENSACION DE LOS DISCOS



POSTERIORMENTE SE INCORPORÓ A LOS DISCOS DE PAPEL FILTRO CON LA AYUDA DE UNA MICROPIPETA EL SIGUIENTE VOLUMEN 10 UL DE LOS ACEITES ESENCIALES.



PARA LOS GRUPOS CONTROL SE COLOCÓ LOS DISCOS DE PAPEL FILTRO EMBEBIDOS CON CLORHEXIDINA AL 0.12% SOBRE LA SUPERFICIE INOCULADA EN EL MEDIO DE CULTIVO.



INCUBACIÓN

Las placas fueron llevadas a incubar en posición invertida a 36.7 °C las primeras 24 hrs.



ANEXO N° 6

CUADRO DE RESULTADOS A LAS 24 HORAS DE LA PRUEBA PILOTO



INFORME N° 25 AM-SERVISALUD 2016

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE FOENICULUM VULGARE (HINOJO), CYMBOPOGON CITRUS (HIERBA LUISA), ORIGANUM VULGARE (OREGANO), CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE (LIMÓN) Y CITRUS SINESIS (NARANJA), FRENTE A CEPAS ESTANDARIZADAS DE STREPTOCOCCUS MUTANS (ATCC 25175)


PRUEBA PILOTO

Fecha : 06/04/2016
Concentración de Aceite Esencial : 100%
Metodología : Kirby & Bauer.

Aceite esencial	Tiempo de lectura (horas de incubación 37°C)	Halo de Inhibición (diámetro mm)		Halo de inhibición de referencia (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%)		Sensibilidad	
		Mueller Hilton Agar	Agar Sangre	Mueller Hilton Agar	Agar Sangre	Sensible	Resistente
Yerba Luisa	24	32.7	32.0	10	9	X	
Orégano	24	15	10	10	9	X	
Hinojo	24	13.5	12	10	9	X	
Limón	24	1.0	0.8	10	9		X
Naranja	24	11.5	10.3	10	9	X	

Cusco, 06 de Junio del 2016

MPLA/MCYM


3
María Del Carmen Váñez Muñiz
BIÓLOGO
C.B.P 8298



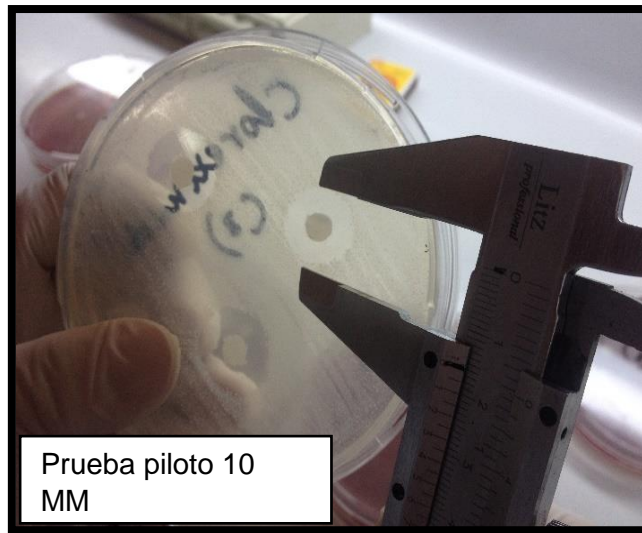
Av. Tomasa Tito Condemayta N° 844 ☎ 251 288
Av. de la Cultura 1214, 2º Piso, Of. 202 ☎ 232 454
Av. de la Cultura 1302, 2º Piso, Of. 206 ☎ 232 992
info@laboratorioservisalud.com

MEDICION DE DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICION DE CRECIMIENTO BACTERIANO

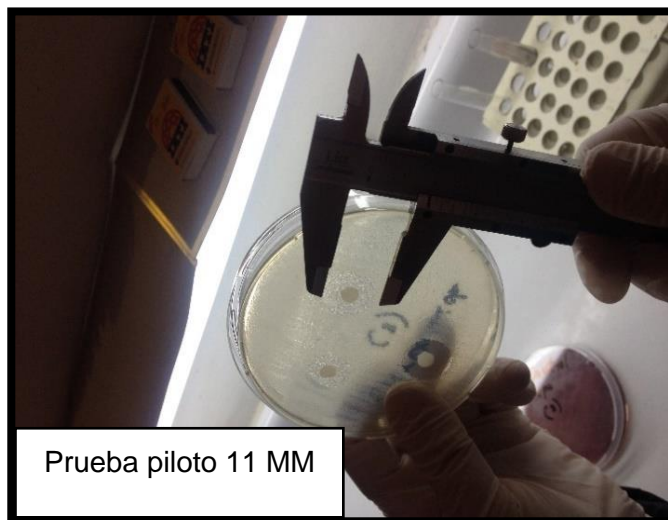
Se leyó el diámetro de los halos de inhibición alrededor del disco; se utilizó el Viener (regla milimetrada).

PATRON DE CONTROL CLOREXIDINA AL 0.12 %

A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS



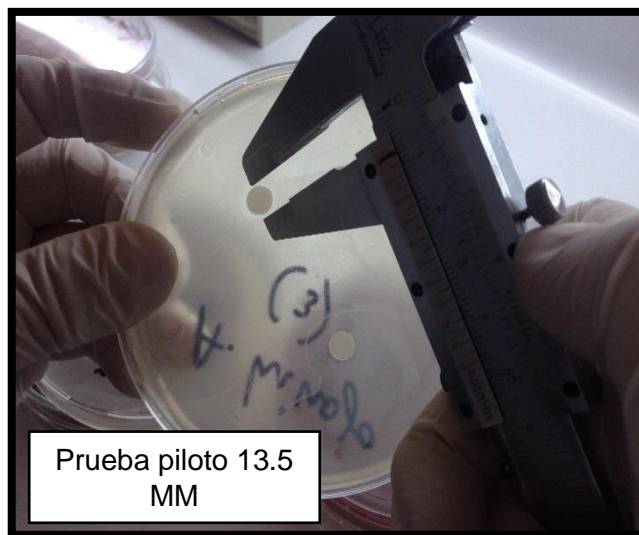
A LAS 72 HORAS



Prueba Piloto
11MM

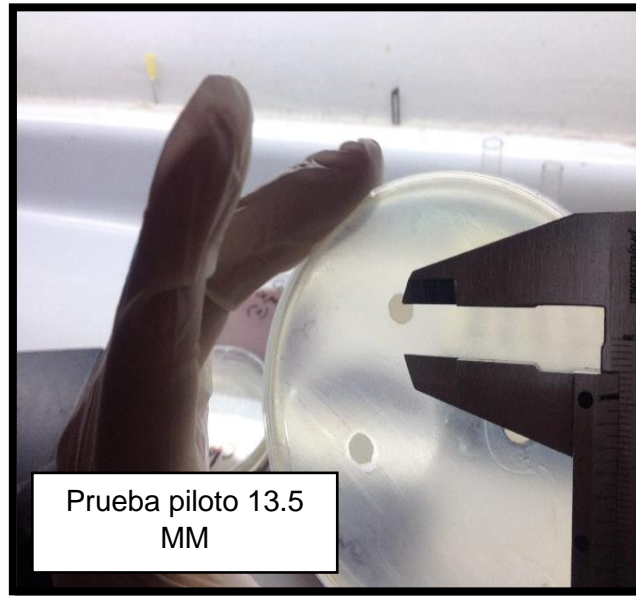
ACEITE DE HINOJO

A LAS 24 HORAS

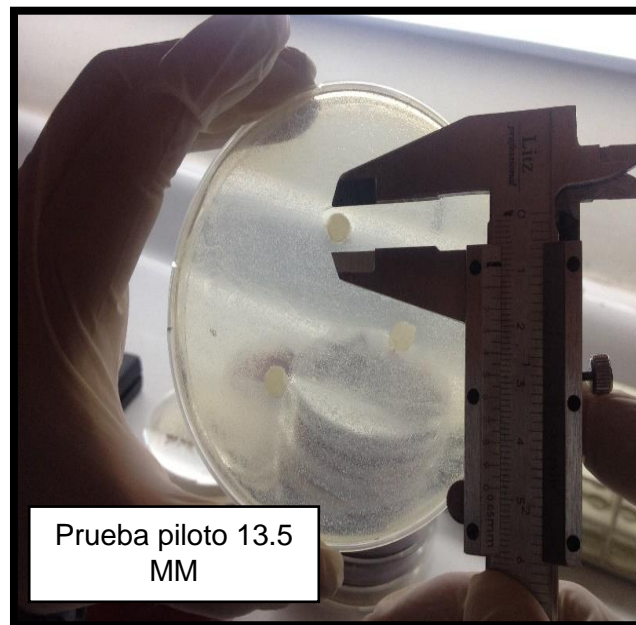


Prueba piloto 13.5
MM

A LAS 48 HORAS

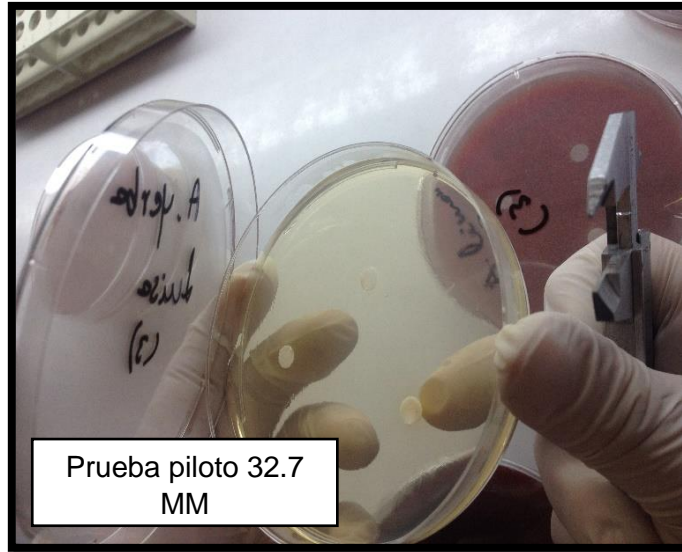


A LAS 72 HORAS

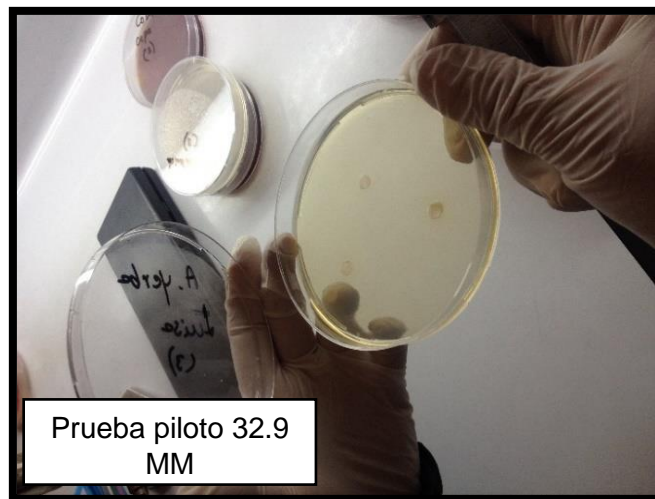


ACEITE DE HIERBA LUISA

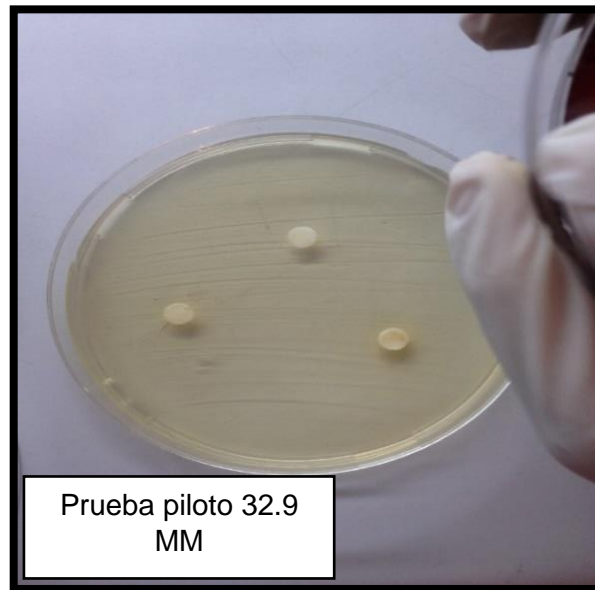
A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

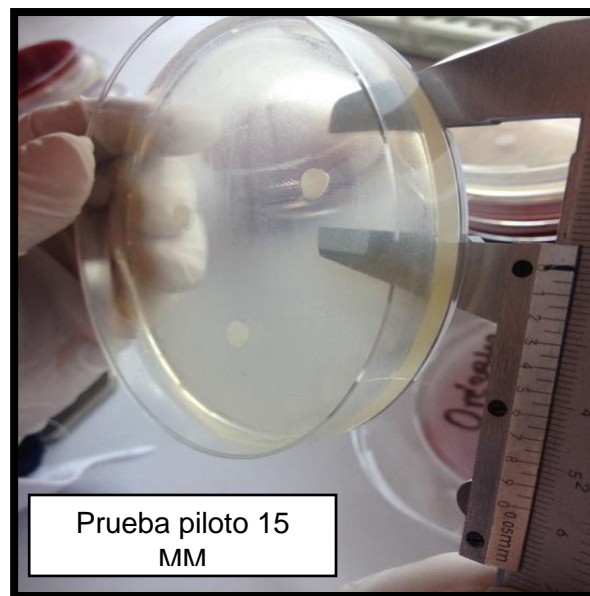


A LAS 72 HORAS

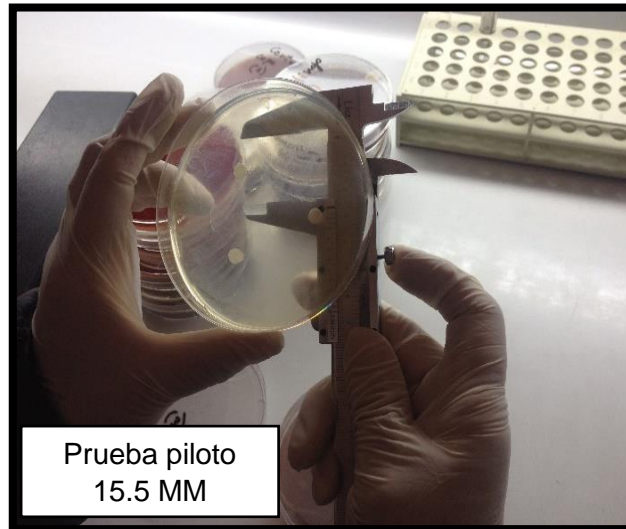


ACEITE DE ORÉGANO

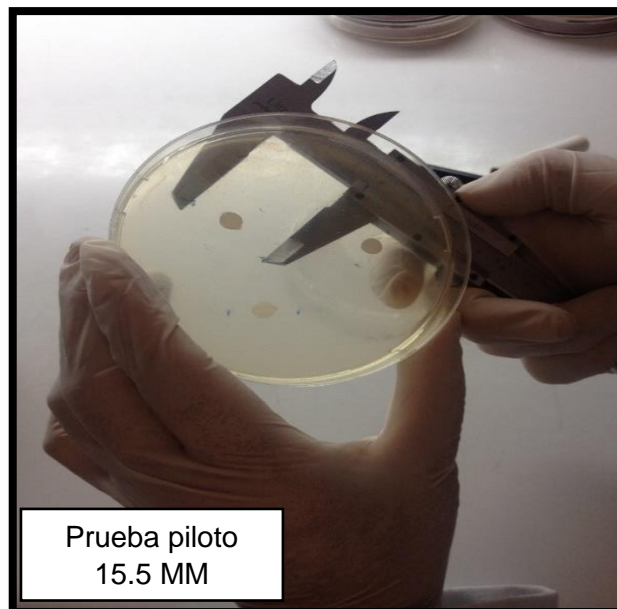
A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

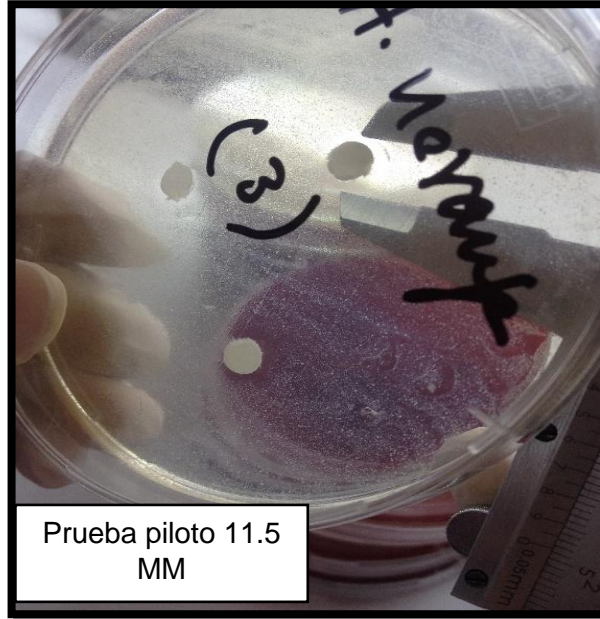


ALAS 72 HORAS

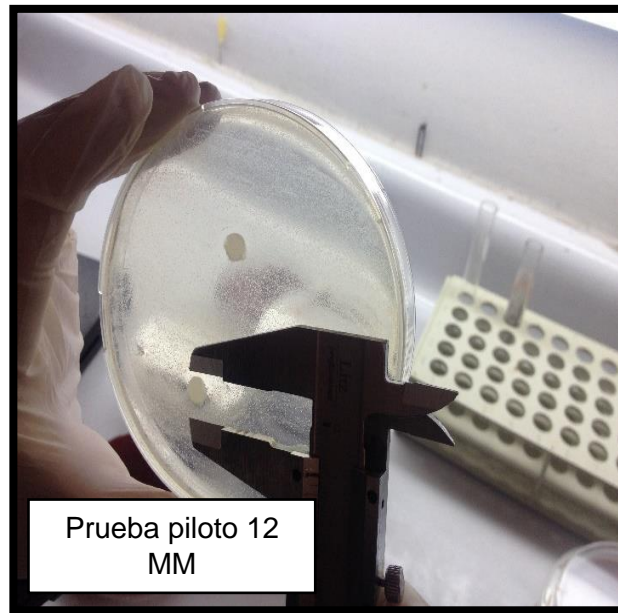


ACEITE DE NARANJA

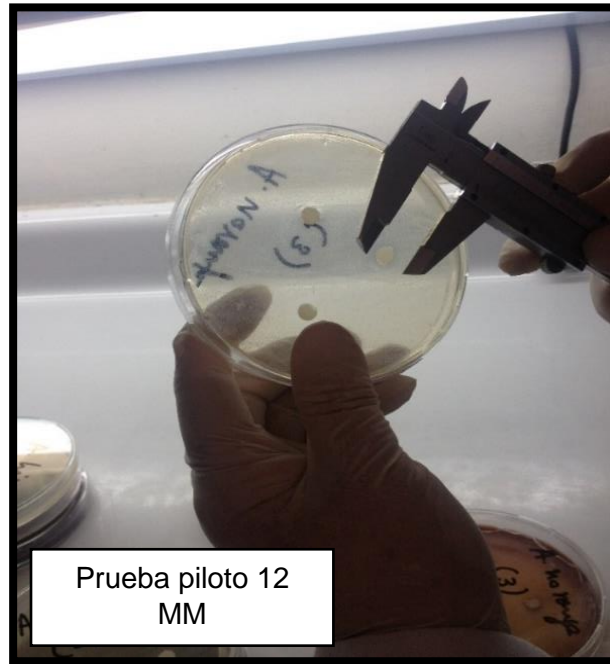
A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

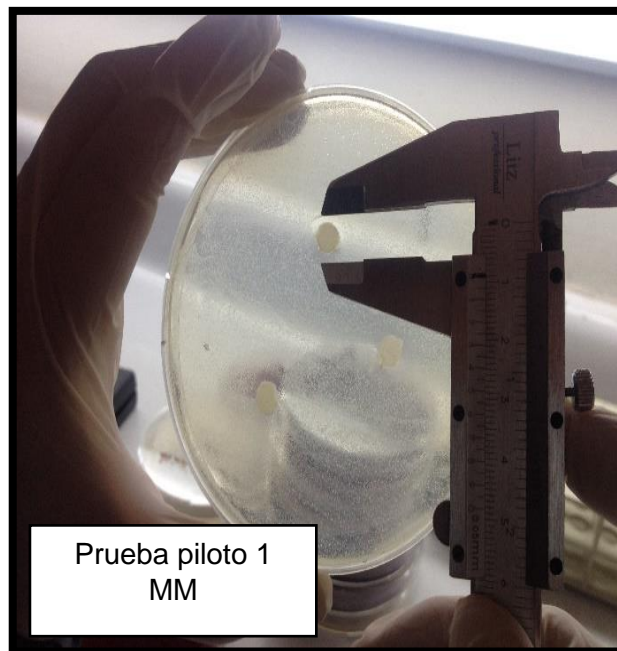


A LAS 72 HORAS

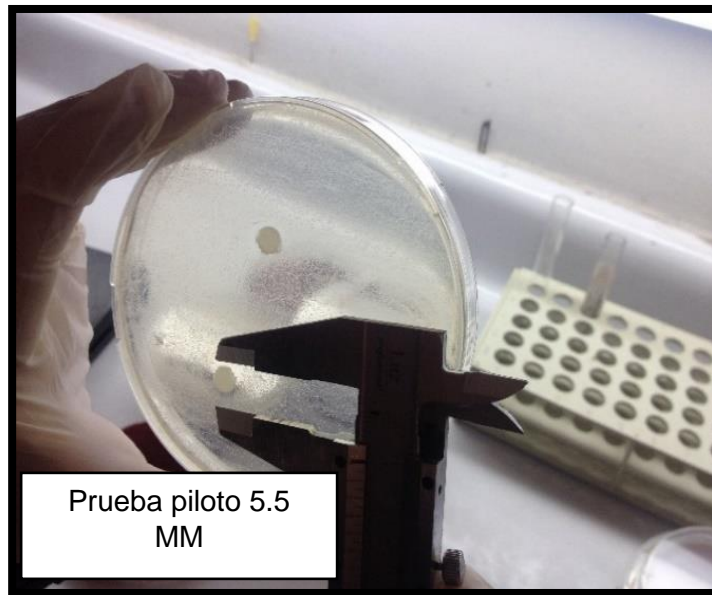


ACEITE DE LIMÓN

A LAS 24 HORAS

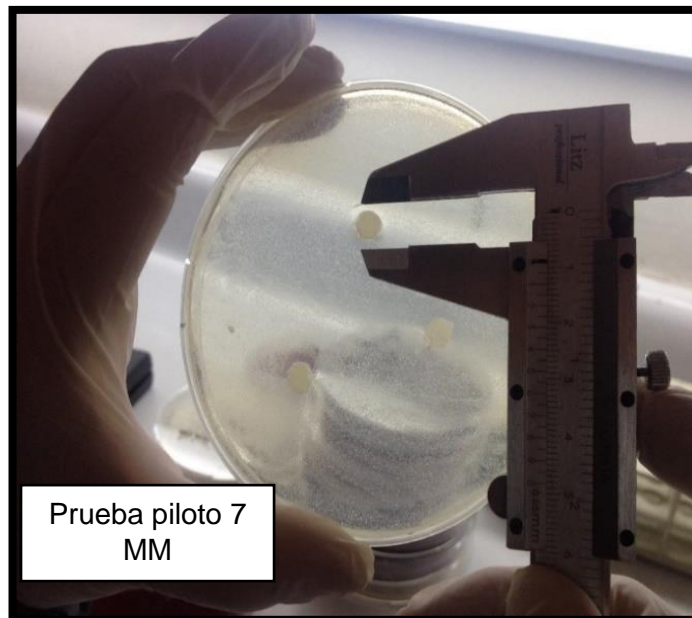


A LAS 48 HORAS



Prueba piloto 5.5
MM

A LAS 72 HORAS



Prueba piloto 7
MM

ANEXO N° 7

CERTIFICACION DE RESULTADOS



INFORME N° 25 AM-SERVISALUD 2016

ANALISIS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE CYMBOPOGON CITRUS (Hierba Luisa), A ESTREPTOCOCUS MUTANS (ATCC 25175)

CORRIDA

Fecha : 26/04/2016
Concentración de Aceite Esencial : 100%
Metodología : Kirby & Bauer

Aceite esencial	Tiempo de lectura (horas de incubación)	Halo de Inhibición (diámetro mm)	Halo de inhibición de referencia (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%)	Sensibilidad	
		Mueller Hilton Agar	Mueller Hilton Agar	Sensible	Resistente
Hierba Luisa	24	33.0	14	X	

Cusco, 06 de Junio del 2016

MPLA/MCYM

Maria Del Carmen Yáñez Mujica
BIÓLOGO
C. D. N° 2299



Av. Tomasa Tito Condemayta N° 844 ☎ 251 288
Av. de la Cultura 1214, 2° Piso, Of. 202 ☎ 232 454
Av. de la Cultura 1302, 2° Piso, Of. 206 ☎ 232 992
info@laboratorioservisalud.com



INFORME N° 25 AM-SERVISALUD 2016

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE ORIGANUM VULGARE (Orégano) A ESTREPTOCOCUS MUTANS (ATCC 25175)

CORRIDA

Fecha : 26/04/2016
 Concentración de Aceite Esencial : 100%
 Metodología : Kirby & Bauer

Aceite esencial (Antibacteriano)	Tiempo de lectura (horas de incubación)	Halo de Inhibición (diámetro mm)	Halo de inhibición de referencia (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%)	Sensibilidad	
		Mueller Hilton Agar	Mueller Hilton Agar	Sensible	Resistente
Orégano	24	16.3	14	X	

Cusco, 06 de Junio del 2016

MPLA/MCYM

Maria Del Carmen Yáñez Mujica
 María Del Carmen Yáñez Mujica
 BIÓLOGO
 C.B.P 8298

5



Av. Tomasa Tito Condemayta N° 844 ☎ 251 288
 Av. de la Cultura 1214, 2º Piso, Of. 202 ☎ 232 454
 Av. de la Cultura 1302, 2º Piso, Of. 206 ☎ 232 992
 info@laboratorioservisalud.com



INFORME N° 25 AM-SERVISALUD 2016

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE
FOENICULUM VULGARE (Hinojo) A ESTREPTOCOCUS MUTANS (ATCC 25175)CORRIDA

Fecha : 26/04/2016
Concentración de Aceite Esencial : 100%
Metodología : Kirby & Bauer

Aceite esencial	Tiempo de lectura (horas de incubación)	Halo de Inhibición (diámetro mm)	Halo de inhibición de referencia (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%)	Sensibilidad	
		Mueller Hilton Agar	Mueller Hilton Agar	Sensible	Resistente
Hinojo	24	15.0	14	X	

Cusco, 06 de Junio del 2016

MPLA/MCYM

Maria Del Carmen Yáñez Mujica
BIÓLOGO
C.B.P 8298

6



Av. Tomasa Tito Condemayta N° 844 ☎ 251 288
Av. de la Cultura 1214, 2º Piso, Of. 202 ☎ 232 454
Av. de la Cultura 1302, 2º Piso, Of. 206 ☎ 232 992
✉ info@laboratorioservisalud.com



INFORME N° 25 AM-SERVISALUD 2016

ANALISIS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE
CITRUS AURANTIFOLIA SWINGLE (Limon) A ESTREPTOCOCUS
MUTANS (ATCC 25175)CORRIDA

Fecha : 26/04/2016
Concentración de Aceite Esencial : 100%
Metodología : Kirby & Bauer

Aceite esencial	Tiempo de lectura (horas de incubación)	Halo de Inhibición (diámetro mm)	Halo de inhibición de referencia (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%)	Sensibilidad	
		Mueller Hilton Agar	Mueller Hilton Agar	Sensible	Resistente
Limón	24	9.5	14		X

Cusco, 06 de Junio del 2016

MPLA/MCYM

7
María Del Carmen Yáñez Mujica
BIÓLOGO
C.B.P. 8298



Av. Tomasa Tito Condemayta N° 844 ☎ 251 288
Av. de la Cultura 1214, 2° Piso, Of. 202 ☎ 232 454
Av. de la Cultura 1302, 2° Piso, Of. 206 ☎ 232 992
✉ info@laboratorioservisalud.com



laboratorioservisalud.com

INFORME N° 25 AM-SERVISALUD 2016

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE ACEITE ESENCIAL DE
CITRUS SINENSIS (Naranja) A ESTREPTOCOCUS MUTANS (ATCC
25175)CORRIDA

Fecha : 26/04/2016
Concentración de Aceite Esencial : 100%
Metodología : Kirby & Bauer

Aceite esencial Antibacteriano	Tiempo de lectura (horas de incubación)	Halo de Inhibición (diámetro mm)	Halo de inhibición de referencia (Gluconato de Clorhexidina al 0.12%)	Sensibilidad	
		Mueller Hilton Agar	Mueller Hilton Agar	Sensible	Resistente
Naranja	24	14.5	14	X	

Cusco, 06 de Junio del 2016

MPLA/MCYM

María Del Carmen Yáñez Mujica
BIÓLOGO
C.B. 8258

8



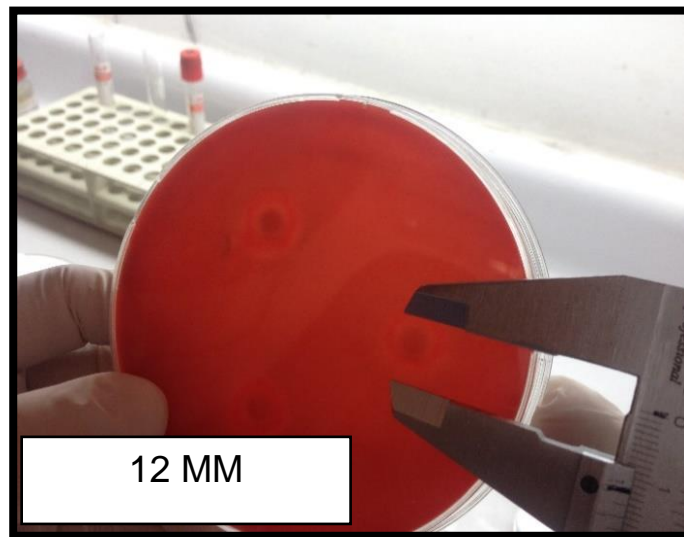
Av. Tomasa Tito Condemayta N° 844 ☎ 251 288
Av. de la Cultura 1214, 2º Piso, Of. 202 ☎ 232 454
Av. de la Cultura 1302, 2º Piso, Of. 206 ☎ 232 992
✉ info@laboratorioservisalud.com

MEDICION DE DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICION DE CRECIMIENTO BACTERIANO

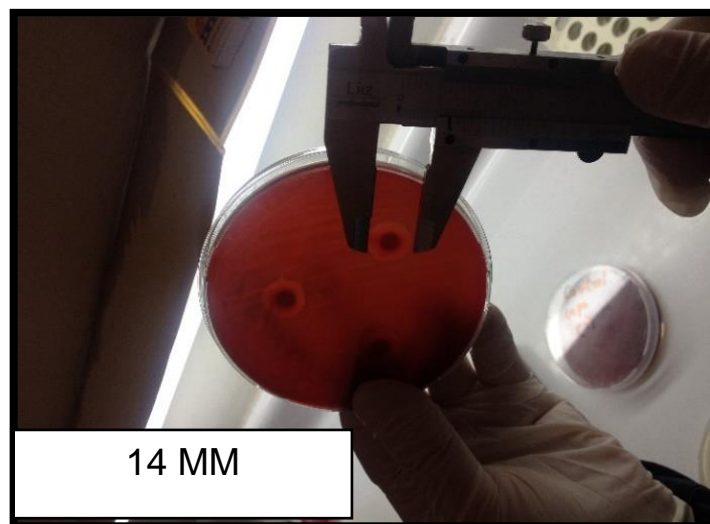
Se leyó el diámetro de los halos de inhibición alrededor del disco; se utilizó el Viener (regla milimetrada).

PATRON DE CONTROL CLOREXIDINA AL 0.12 %

A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

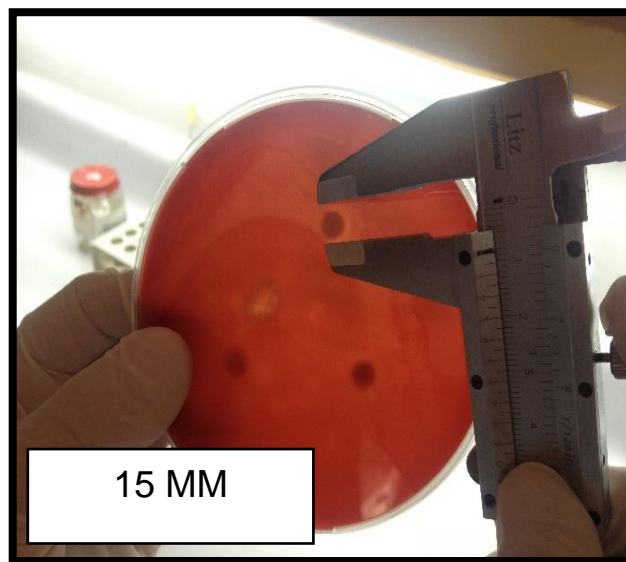


A LAS 72 HORAS

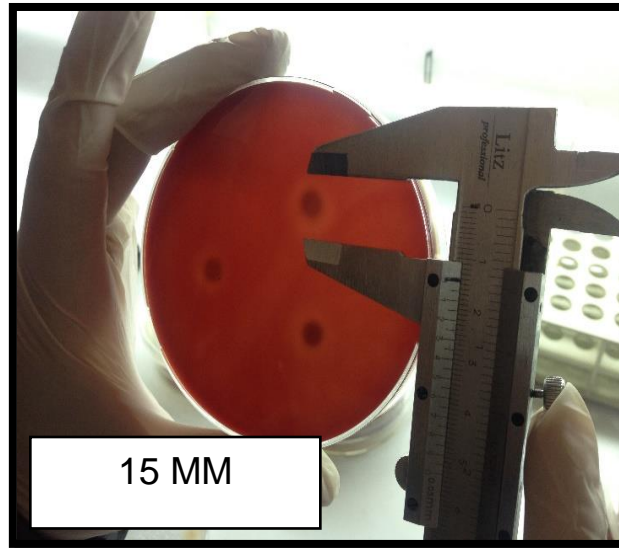


ACEITE DE HINOJO

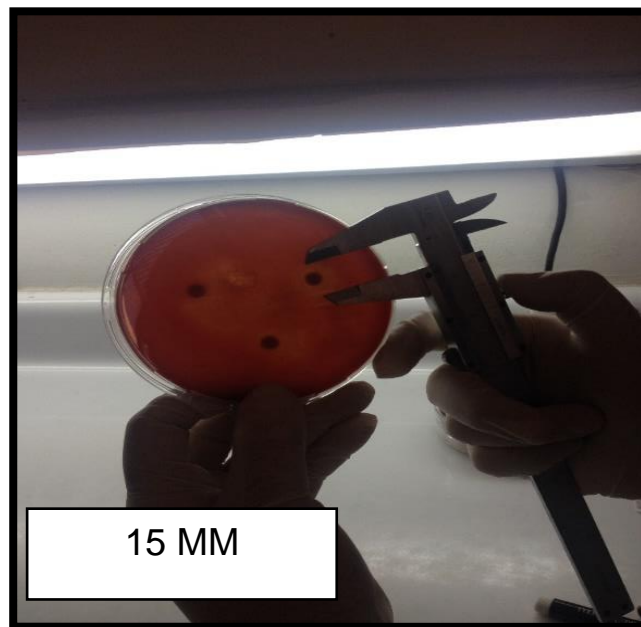
A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

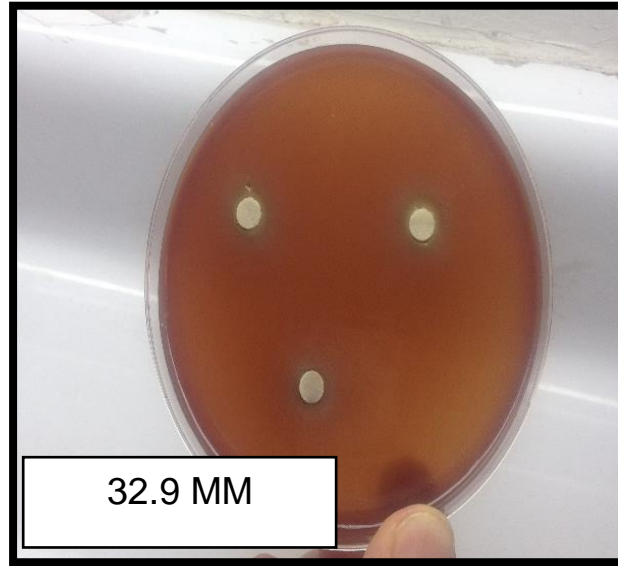


A LAS 72 HORAS

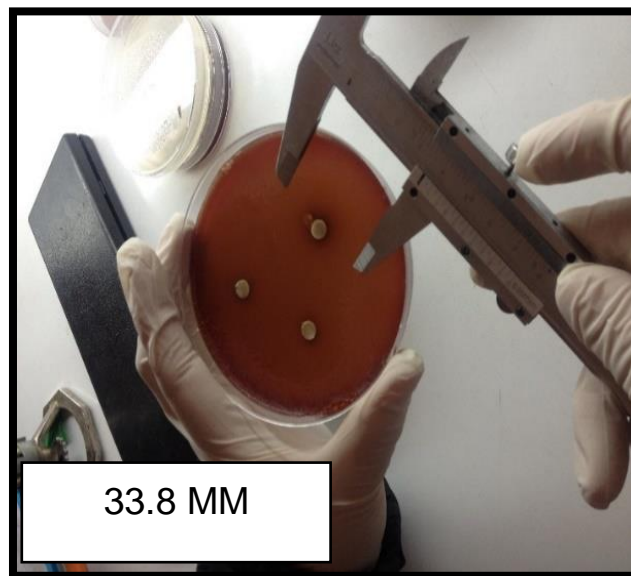


ACEITE DE HIERBA LUISA

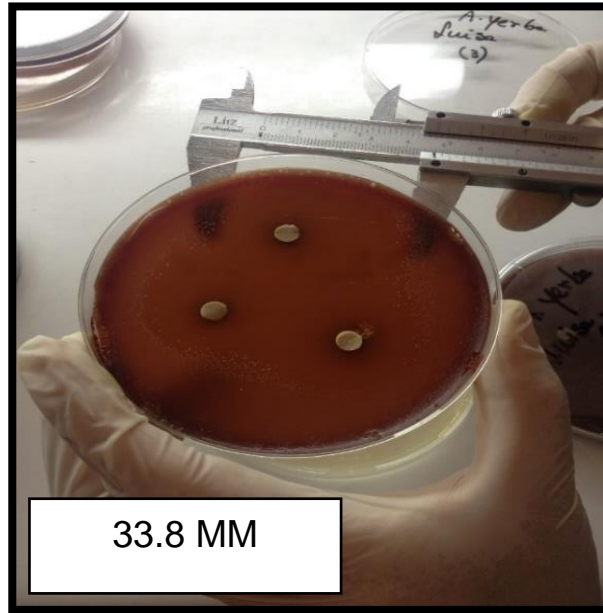
A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

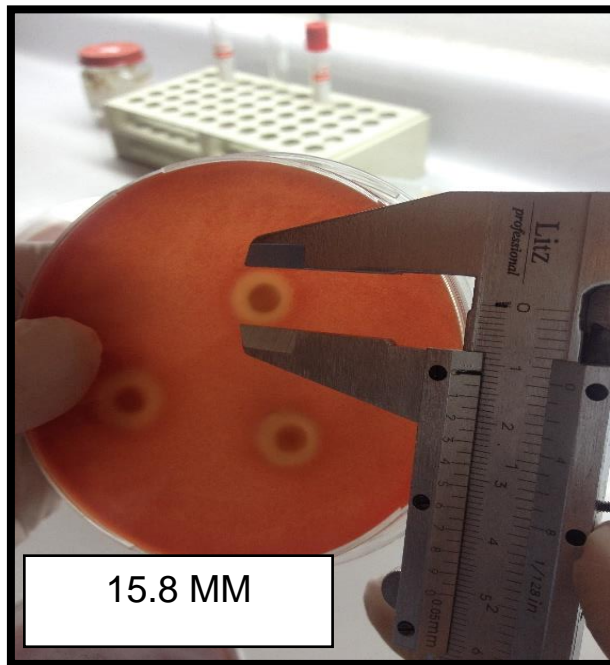


A LAS 72 HORAS

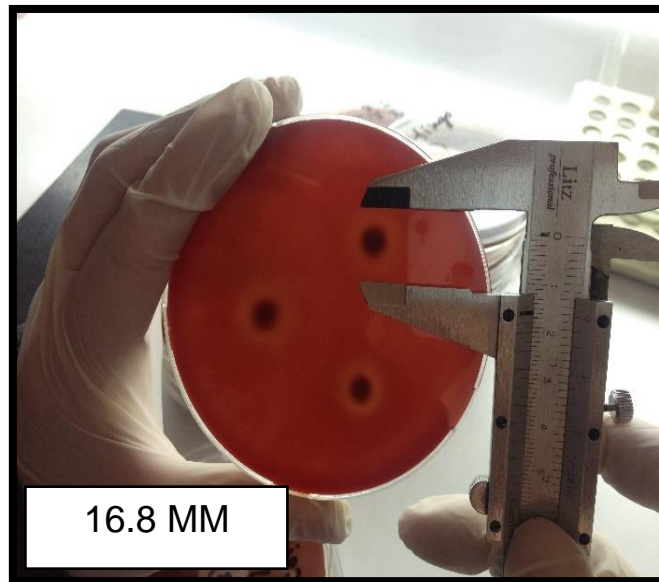


ACEITE DE ORÉGANO

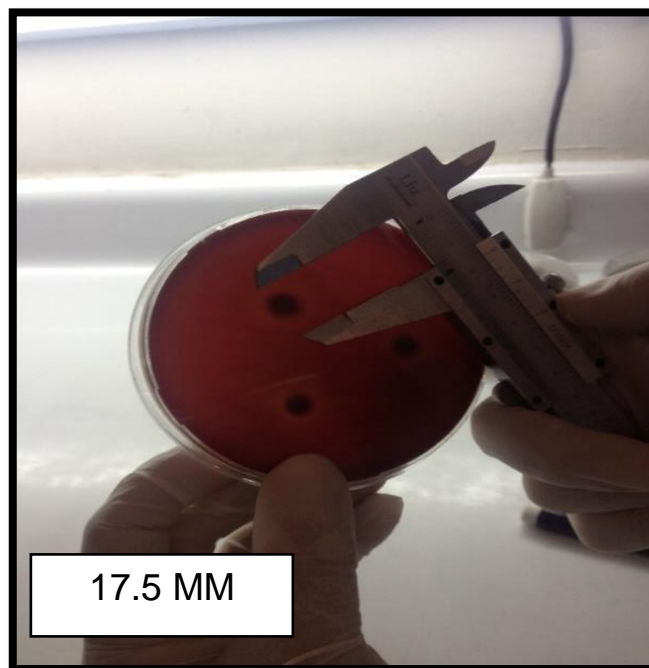
A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

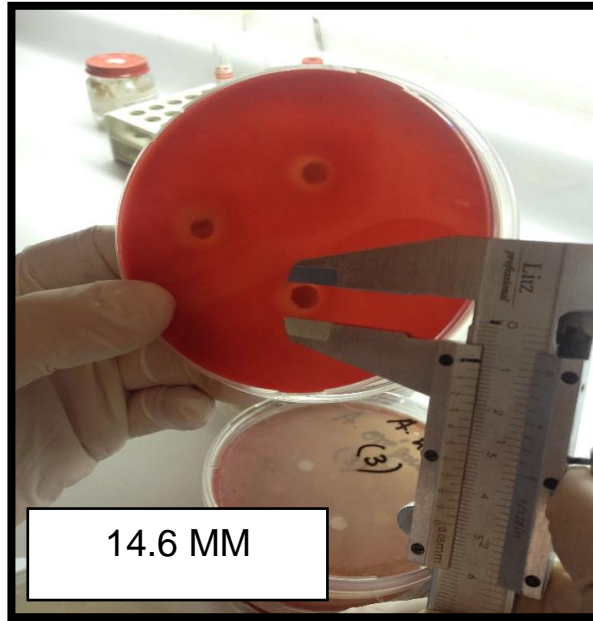


ALAS 72 HORAS

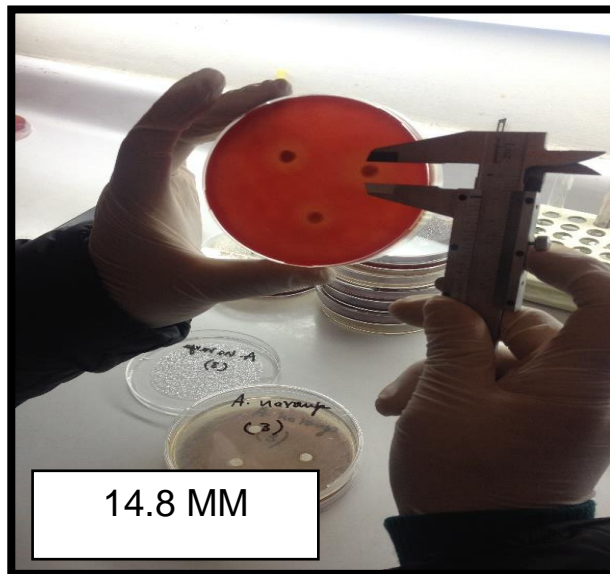


ACEITE DE NARANJA

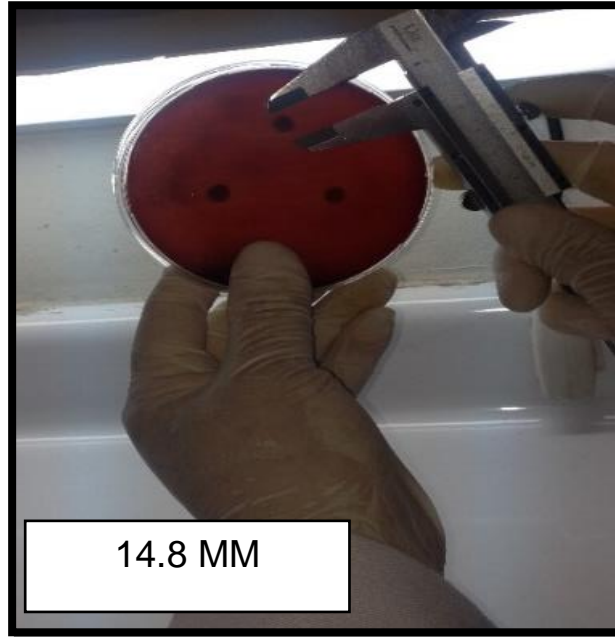
A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS

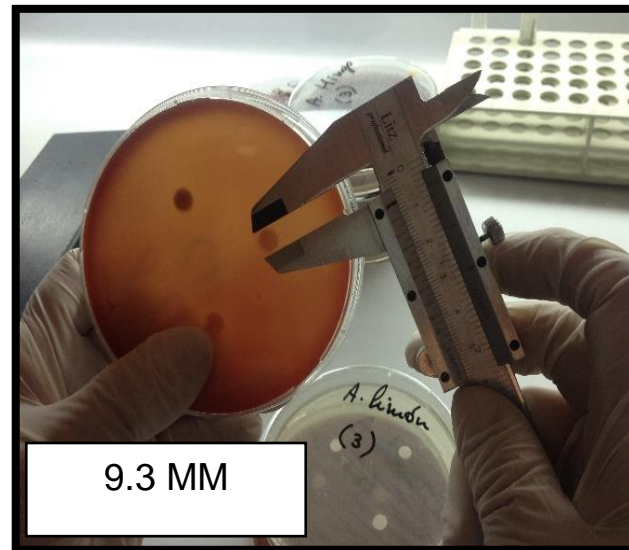


A LAS 72 HORAS

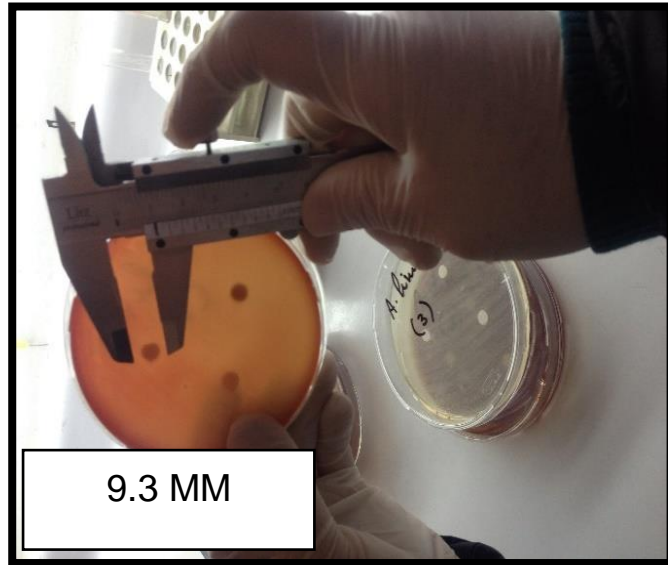


ACEITE DE LIMÓN

A LAS 24 HORAS



A LAS 48 HORAS



A LAS 72 HORAS

