

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA



CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DEL
***Minthostachys mollis* (MUÑA), FRENTE A LA ACTIVIDAD BACTERIANA DE**
***Streptococcus mutan* y *Porphyromonas gingivalis*.PUNO 2013”**

TESIS: PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA

PRESENTADO POR:
BACH. SOFIA NANCY CCALLO LAUCATA

PUNO – PERU

2013

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA“CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Minthostachys mollis (MUÑA) FRENTE A LA ACTIVIDAD
BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.
PUNO-2013”

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

PRESENTADA POR:

Bach. SOFIA NANCY CCALLO LAUCATA

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE

:

C.D. VLADIMIR HUACASI SUPO

PRIMER MIEMBRO

:

M.Sc. CIRIA TRIGOS RONDÓN

SEGUNDO MIEMBRO

:

C. D. DAVID CAMAPAZA VELÁSQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

:

Mg. SONIA MACEDO VALDIVIA

ASESOR DE TESIS

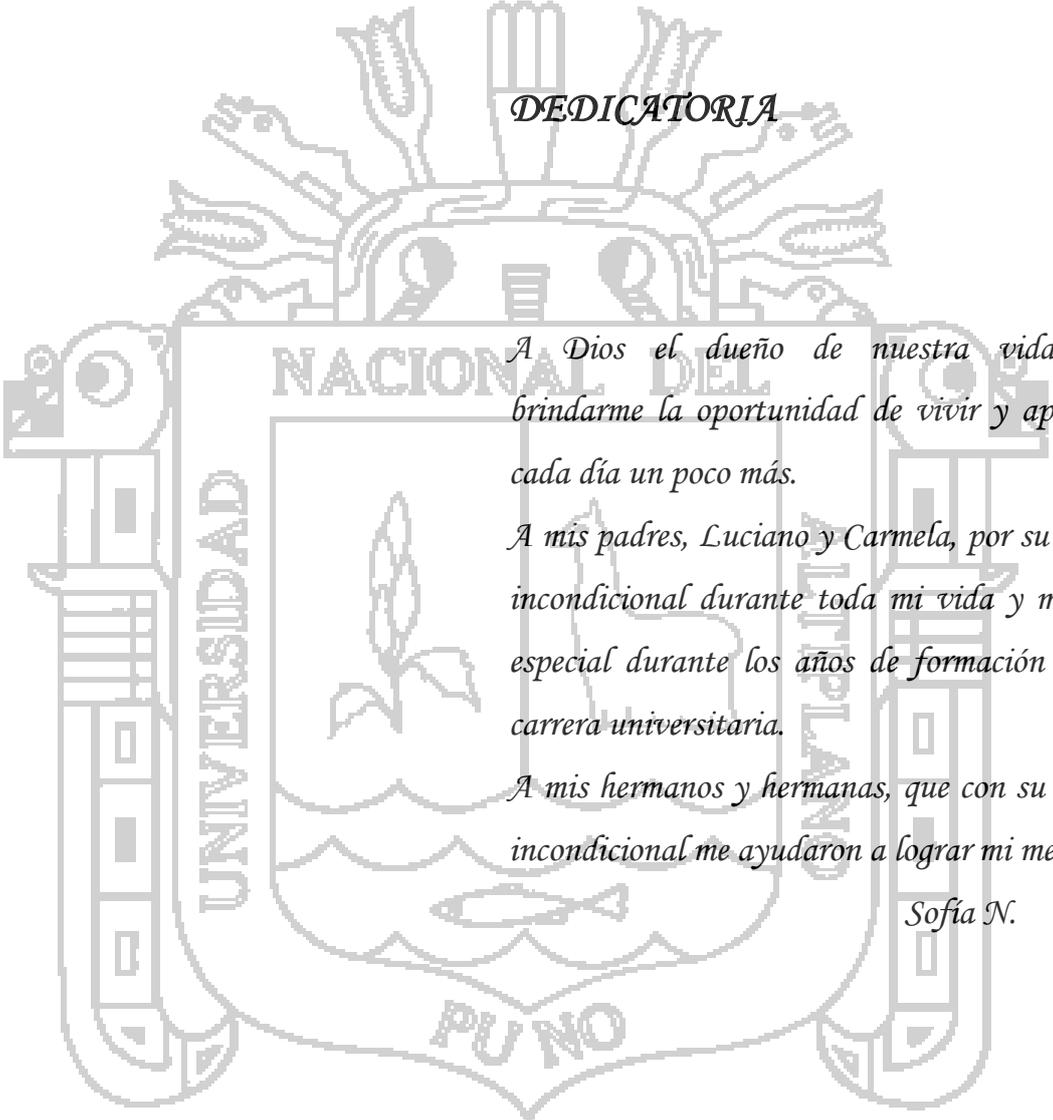
:

C.D. ROCÍO APAZA CUNO

1

Área: Odontología

Tema: Ensayos clínicos y preclínicos



DEDICATORIA

A Dios el dueño de nuestra vida, por brindarme la oportunidad de vivir y aprender cada día un poco más.

A mis padres, Luciano y Carmela, por su apoyo incondicional durante toda mi vida y muy en especial durante los años de formación de mi carrera universitaria.

A mis hermanos y hermanas, que con su ayuda incondicional me ayudaron a lograr mi meta.

Sofía N.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sinceros agradecimientos a todas personas que han contribuido directa o indirectamente al desarrollo de la presente investigación.

A la Universidad Nacional del Altiplano y en especial a la Escuela Profesional de Odontología, que me acogieron en sus aulas durante los años de mi formación profesional.

A mi directora Dra. Sonia Macedo Valdivia por el apoyo brindado en la culminación de presente trabajo.

A mi asesora Dra. Roció Apaza Cuno por su orientación y concejo profesional durante la realización del presente trabajo.

A los señores miembros del jurado calificador Dr. Vladimir Huacasi Supo, M.Sc. Ciria Trigos Rondón y Dr. David Camapaza Velásquez, por sus correcciones y consejos.

Al Lic. Lorgio Palacios y Sra. Guiliana Ccama trabajadores del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana por el apoyo brindado, entusiasmos y paciencia en la realización de este trabajo.

A todos mi docentes quienes con su conocimiento ayudaron a formar mi perfil profesional.

Un agradecimiento especial a mí cuñado Martín, por todo el apoyo que me brindo en la ejecución de este trabajo.

Y muy especialmente a mi familia, a mis padres, hermanos, hermanas y sobrinos por su aliento y motivación en la ejecución de este trabajo.

Y a mí amiga Yanet por brindarme su amistad, confianza y comprensión en los momentos malos. Gracias por estar ahí siempre que lo necesito.

ÍNDICE

| | Pág. |
|---------------------|------|
| DEDICATORIA..... | II |
| AGRADECIMIENTO..... | III |
| ÍNDICE..... | IV |
| RESUMEN..... | VII |
| ABSTRAC..... | VIII |
| INTRODUCCIÓN..... | IX |

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

| | | |
|-------|---------------------------------------|---|
| 1.1 | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 2 |
| | Formulación del problema..... | 3 |
| 1.2 | ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN..... | 4 |
| 1.2.1 | Internacionales..... | 4 |
| 1.2.2 | Nacionales..... | 4 |
| 1.2.3 | Locales..... | 6 |

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

| | | |
|-------|---------------------------------------|----|
| 2.1 | MARCO TEORICO..... | 9 |
| 2.1.2 | <i>Streptococcus mutans</i> | 9 |
| 2.2.2 | <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 12 |
| 2.1.3 | Plantas Medicinales..... | 16 |
| 2.1.4 | Aceites Esenciales..... | 21 |
| 2.2 | MARCO CONCEPTUAL..... | 28 |
| 2.3 | HIPÓTESIS..... | 29 |
| 2.3.1 | Hipótesis General..... | 29 |
| 2.3.2 | Hepótesis Específico..... | 29 |
| 2.4 | OBJETIVOS..... | 29 |
| 2.4.1 | Objetivo General..... | 29 |
| 2.4.2 | Objetivo Específico..... | 29 |

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS

| | | |
|-----|--------------------------------------|----|
| 3.1 | DISEÑO DE ESTUDIO..... | 32 |
| 3.2 | MUESTRA DE INVESTIGACIÓN..... | 32 |
| 3.3 | INSTRUMENTO..... | 32 |
| 3.4 | TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS..... | 32 |
| 3.5 | RECOLECCIÓN DE DATOS..... | 32 |
| 3.6 | CONSIDERACIONES ETICAS..... | 37 |
| 3.7 | VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO..... | 37 |
| 3.8 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... | 38 |
| 3.9 | RECURSOS..... | 38 |

CAPITULO IV CARACTERIZACIÓN DEL AREA DE INVESTIGACIÓN

ESTUDIO

| | | |
|-----|------------------------|----|
| 4.1 | ÁMBITO EN ESTUDIO..... | 43 |
|-----|------------------------|----|

CAPITULO V RESULTADOS

| | | |
|-----|--------------------------------------------|----|
| 5.1 | DISCUSIÓN..... | 52 |
| 5.2 | CONCLUSIONES..... | 54 |
| 5.3 | RECOMENDACIONES..... | 55 |
| 5.4 | BIBLIOGRAFIA Y FUENTES DE INFORMACIÓN..... | 56 |

INDICE DE TABLAS

| | | |
|--------------|--|----|
| Tabla 1..... | | 46 |
| Tabla 2..... | | 48 |
| Tabla 3..... | | 50 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|---------------|--|----|
| Figura 1..... | | 47 |
| Figura 2..... | | 49 |
| Figura 3..... | | 51 |

ÍNDICE ANEXOS

| | |
|--------------|----|
| Anexo 1..... | 61 |
| Anexo 2..... | 63 |
| Anexo 3..... | 64 |
| Anexo 4..... | 65 |
| Anexo 5..... | 66 |
| Anexo 6..... | 67 |
| Anexo 7..... | 68 |



RESUMEN

La investigación se realizó con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (muña) frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Se trabajó con muestras tipificadas de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* y el aceite esencial de la muña. La investigación se realizó en tres etapas; la Primera de recolección de la especie mencionada en la localidad de Marangani, Provincia de Canchis, en el Departamento de Cusco; la segunda etapa de obtención del aceite esencial, por el método de destilación de arrastre a vapor de agua a partir de las hojas desecadas de *Minthostachys mollis* (muña), en el laboratorio de procesos y operaciones unitarias de la Facultad de Ingeniería Química y la tercera etapa, en la cual se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), para lo que se utilizó el método de macrodilución en caldo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana. Se empleó análisis descriptivo para obtener los promedios y desviaciones estándar de las variables de las cepas bacterianas estudiadas, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa del efecto de inhibición del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) a diferentes concentraciones frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* $P < 0.01$ ANOVA y del efecto de inhibición del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) a diferentes concentraciones frente a la actividad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* $P < 0.01$ ANOVA. Se utilizó la prueba T- Student para determinar la diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) del efecto inhibitorio de aceite esencial frente al *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Los resultados fueron que la concentración mínima inhibitoria para *Streptococcus mutans* es 0.448g/ml de aceite esencial, ya que la concentración inhibe el 50% del crecimiento bacteriano y para *Porphyromonas gingivalis* es mayor a 0.448g/ml de aceite esencial, ya que es la mayor concentración en la que se trabajó y solo se inhibió el 23.05 % de crecimiento bacteriano. Se concluye que el aceite esencial de muña inhibe a *Streptococcus mutans* y a *Porphyromonas gingivalis*.

Palabras clave: aceite esencial, muña, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, bacterias.

ABSTRACT

The research was conducted in order to determine the minimum inhibitory concentration of essential oil *Minthostachys mollis* (muña) against bacterial activity of *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* . We worked with typed samples *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* and essential oil muña . The research was conducted in three stages: the first collection of the species mentioned in the town of Marangani , Canchis Province , in the Department of Cusco , the second step of obtaining the essential oil by distillation of steam drag water from the dried leaves of *Minthostachys mollis* (muña) , in laboratory processes and unit operations of the Faculty of Chemical Engineering and the third stage, in which the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined , for which macrodilution method was used in broth *Minthostachys mollis* essential oil (muña) in the microbiology laboratory of the Faculty of Human Medicine . Descriptive analysis was used to obtain the means and standard deviations of the variables of the bacterial strains studied , a statistically significant difference in effect of inhibition of the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) at different concentrations against bacterial activity of *Streptococcus* was obtained mutans $P < 0.01$ ANOVA and the inhibition effect of the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) at different concentrations of bacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* $P < 0.01$ ANOVA . Student 's t- test was used to determine statistically significant differences ($P < 0.05$) the inhibitory effect of essential oil against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* . The results were that the minimum inhibitory concentration for *Streptococcus mutans* is 0.448g/ml essential oil as the concentration inhibiting 50% of bacterial growth and to *Porphyromonas gingivalis* is greater than 0.448g/ml essential oil because it is the highest concentration in which they worked and only 23.05 % of inhibited bacterial growth. We conclude that the essential oil muña inhibits *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* .

Keywords: essential oil, muña , *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* bacteria

INTRODUCCIÓN

La condición de la salud bucal a nivel mundial, atraviesa una situación crítica debido a las altas prevalencias de enfermedades cariogenicas y peridontopatogenicas; la información de la prevalencia de caries dental es de 90% y la enfermedad periodontal 85% constituyendo un problema de salud pública (MINSA 2005),¹ motivo por el cual se optó en investigar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (Muña) frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, en base a estudios realizados por diferentes investigadores, para elaborar productos dentales a base de plantas medicinales y reducir la alta prevalencia de estas enfermedades. Las plantas medicinales han acompañado la evolución del hombre y forman parte de la curación ancestral, la organización mundial de la salud estima que casi el 80% de todos los habitantes de la tierra confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud.¹ *Minthostachys mollis* nombre científico de la Muña, es una planta medicinal usada en diversas maneras como: antiespasmódico, aromatizante, dolores reumáticos, contra el dolor de estómago, también es usado como conservantes de alimentos. El aceite esencial del *Minthostachys mollis* (Muña), según varias investigaciones posee propiedades antibacterianos, antimicóticos, antiparasitaria e insecticida.²

La caries es una enfermedad infecciosa y multifactorial de los dientes, que se caracteriza por la desintegración progresiva de sus tejidos calcificados, debido a la acción de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta. Las enfermedades periodontales han adquirido gran importancia porque afectan a un alto porcentaje de la población y constituyen la primera causa de perdida dental. Se caracteriza por una serie de estados clínicos en donde se presenta inflamación y destrucción que afectan al periodonto.³

En este trabajo de investigación se determinó la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, El estudio servirá para disminuir el potencial patógeno de estas especies, constituyendo de esta manera una alternativa en la prevención de las enfermedades cariogenicas y periodontales, también para establecer una base en la futura elaboración de un producto aplicable en la práctica odontológica.

CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN



1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La caries dental y la enfermedad periodontal sigue siendo un problema a nivel mundial, una infección endémica, crónica, multifactorial y transmisible, además representa un problema de salud pública.² Afecta a personas de cualquier edad, sexo y raza. Esta situación guarda relación directa con la frecuente presencia de sacarosa en las comidas y la ausencia de hábitos higiénicos. A pesar de que las tasa disminuyeron durante los últimos años, no se registraron muchos cambios. La caries dental junto con la enfermedad periodontal, constituyen el mayor porcentaje de morbilidad dentaria durante toda la vida del individuo³.

Catalogado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como la tercera calamidad sanitaria, después de la enfermedad cardiovascular y el cáncer.³ La caries dental en el Perú afecta al 95% de la población debido a la falta de buenos hábitos de higiene y la inadecuada alimentación, basado primordialmente en carbohidratos, harinas y dulces principalmente en la población infantil,⁴ ya que los odontólogos nos vemos en obligación de evitar su avance usando métodos preventivos y restauradores.³

Las plantas medicinales han acompañado la evolución del hombre, y forman parte del curar ancestral, la organización mundial de la salud estima que casi el 80% de todos los habitantes de la tierra confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud.¹

El empleo de plantas como tratamiento de diversos males, se registran desde tiempos muy remotos, basándose en creencias populares y conocimientos tradicionales, transmitidos de generación en generación.⁵ Hoy en día muchas propiedades terapéuticas de diversas plantas han sido demostradas científicamente, en base de la extracción de sus principios activos.⁵ Se hicieron investigaciones cualitativas de la sensibilidad antibacteriana de aceites esenciales de las plantas como de la *Muña*, donde determinaron su efecto antibacteriano, pero esto no es suficiente para la aplicación clínica de esto antimicrobianos, por lo cual es necesario hacer su estudio cuantitativo donde se determinó la Concentración mínima inhibitoria y de esta manera determinar su dosis de aplicación, y hacer uso inmediato de *Minthostachys mollis* (*Muña*) frente a la bacteria de la caries y enfermedad periodontal y que dichas soluciones en un futuro podrían ser usadas como enjuagues o colutorios y pasta dental a base de *Muña*, y forme parte diaria de la higiene bucal.

En vista de los escasos recursos económicos de las grandes mayorías de nuestra población, tratamos de buscar alternativas de solución a estos problemas con plantas medicinales, a bajo costo para la adquisición de la población.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA GENERAL

¿Cuál será la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) frente a la actividad bacteriana del *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*?

FORMULACIÓN DE PROBLEMAS ESPECÍFICOS

¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* a dosis de 0.056g/ml, 0.112g/ml, 0.0224g/ml, 0.336g/ml, 0.448g/ml?

¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* a dosis de 0.056g/ml, 0.112g/ml, 0.0224g/ml, 0.336g/ml, 0.448g/ml?

¿Cuál será la diferencia al comparar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*?

1.2 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1 Antecedentes internacionales

En la investigación: Evaluación antibacteriana, antifúngica, insecticida y caracterización química de los aceites esenciales extraídos de especies vegetales aromáticos con valor comercial, se determinó la actividad antimicrobiana de *saturaja boliviana*, *Minthostachys mollis* y otras especies vegetales sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritis*, encontrado que *Minthostachys mollis* inhibe el desarrollo de *Staphylococcus aureus* mas de 50mg/ml; a *Bacillus subtilis* a 23mg/ml; *Shigella flexneri* 50mg/ml; *Salmonella enteritis* a 15mg/ml. La muña (*satureja boliviana*) inhibió a *Staphylococcus aureus* a 21mg/ml; a *Bacillus subtilis* a 31mg/ml; a *shigella flexneria* a 16mg/ml; *escherchi coli* a 11mg/ml.⁵

En la investigación: “Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to Brazilian Green propolis extract”. Mediante su estudio en difusión y dilución por agar determinaron la concentración mínima inhibitoria de la *provotella intermedia* (20-50ug/ml), *porphyromonas gingivalis* (30-60ug/ml), *Fusobacterium nucleatum* y *actinomyces actinomycetemcomitans* (30-60ug/ml) y para todas ellas la concentración mínima inhibitoria bactericida fue de 200-400ug/ml formado halo de inhibición de 14 a 17 de diámetro.⁶

1.2.2 Antecedentes nacionales

En la investigación: La actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. Su objetivo fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “ruyaq muña” frente a *Helicobacter pylori*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las hojas de *M. mollis* se colectaron en el distrito de Huamanguilla (3000-3200 msnm), provincia de Huanta, región Ayacucho. El aceite esencial se obtuvo por destilación con arrastre de vapor de agua. La actividad antibacteriana se determinó por el método de excavación placa cultivo; resultando en orden de sensibilidad, para *S. dysenteriae* 21,41 mm; *H. pylori* 17,07 mm; *S. typhi* 14,25 mm y *P. aeruginosa* 11,45 mm. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB)

para *H. pylori* se determinó por el método de dilución en microplacas, resultando 2 µg/mL. Para las demás bacterias se determinó por el método de dilución, siendo para *S. dysenteriae* 4 µg/mL, *S. typhi* 4 µg/mL, y *P. aeruginosa* 9 µg/mL de CMI y 10 µg/mL de CMB. Los porcentajes de inhibición comparados con ciprofloxacino, fueron: *H. pylori* 177,27; *S. dysenteriae* 126,11; *S. typhi* 63,44 y *P. aeruginosa* 42,29 y comparado con cloranfenicol: *P. aeruginosa* de 225,56; *S. dysenteriae* 171,97; *S. typhi* 135,95 y *H. pylori* 92,86. La densidad del aceite esencial es 0,9029 g/mL, índice de refracción 1,56689 y el porcentaje de rendimiento 2,4 v/p. Se detectó presencia de fenoles, los que validan la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *M. mollis*.⁷

En la investigación: Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis. Mediante el método de difusión en disco (Kirby Bauer), se conoció el grado de sensibilidad en función al tamaño del halo de inhibición; por el método de dilución en medio líquido se encontró la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y por difusión en agar se encontró la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial. Se determinó que *Porphyromonas gingivalis* mostró ser muy sensible al aceite esencial. La CMI para *Porphyromonas gingivalis* es 0,31 mg/ml y CMB es 0,37 mg/ml. Llegando a la conclusión que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” presenta actividad antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis* causante de gingivitis.⁸

En la investigación: Efectividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico”, el objetivo fue determinar la efectividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grises “Muña” tanto cuantitativamente como cualitativamente, mediante el método de difusión en agar con disco, frente a tres cepas de bacterias prevalentes de patogénesis periapical crónica: *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Prevotella melaninogénica* ATCC 25845, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y muestras de conducto radicular con Periodontitis Apical Crónica. Se obtuvo el aceite esencial de principios activos totales de las hojas secas, talluelos y flores de la planta mediante arrastre por vapor de agua. Posteriormente, el aceite se diluyó en alcohol etílico al 70° en las concentraciones de 25% y 50%. Estas diluciones, junto a la dilución pura, fueron comparadas con Paramonoclorofenol alcanforado como control positivo y con alcohol etílico al 70°,

como control negativo. Al realizar las pruebas de sensibilidad in vitro se obtuvieron los siguientes resultados: el aceite esencial de *Minthostachys mollis* “muña” puro y en sus diluciones presentó efectividad antibacteriana tanto cuantitativamente como cualitativamente mayor al alcohol etílico al 70° y menor al Paramonoclorofenol alcanforado frente a las muestras bacterianas en estudio.⁹

1.2.3 Antecedentes locales

En la investigación: El efecto antibacteriano de la *Minthostachys mollis grises* (Muña), comparando con la amoxicilina frente a las bacterias de la placa supragingival, la población en estudio fue de 36 muestras, la técnica fue la observación experimental. Los resultados fueron los siguientes: los indicadores estadísticos de los experimentos a las 24 horas, donde se observaron que el promedio del grupo de control es de 22.133 mm, y el grupo experimental es de 23.75mm. La comparación de las modas del grupo control fue de 27mm y el grupo experimental que fue de 12mm. a las 24 horas, se observa que el grupo de control que tiene una mayor moda que el grupo experimental, se presenta la comparación entre las modas del grupo control amoxicilina que fue de 26 mm y el grupo experimental *Minthostachys mollis grises* que fue de 10 mm a las 48 horas, se observa que el grupo de control tienen una mayor moda que el grupo experimental. Llegó a la conclusión de que la amoxicilina posee efecto antibacteriano frente a la bacteria de la placa supragingival a las 24 horas y 48 horas. *Minthostachys mollis grises* si posee efecto antibacteriano frente a las bacterias de la placa supragingival a las 24 y 48 horas. Su efecto antibacteriano es menor en comparación con el efecto antibacteriana de la amoxicilina en las 24 horas y 48 horas.¹⁰

En el estudio realizado sobre “Efecto antibacteriano IN VITRO de *Erythroxylum coca*, llipta y la combinación de ambos en cultivos de *Streotoccus mutans* y *aggregatibacter actinomycetemcomitans*” el objetivo de la investigación fue determinar y comparar el Efecto antibacteriano in vitro de *Erythroxylum coca*, llipta y la combinación de ambos a diferentes concentraciones mediante el método de dilución en agar, frente a las bacteria *Streotococcus mutans* y *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Se prepararon las concentraciones para coca de 20g, 15g, 15g, 10g/100ml, para llipta de 2g, 1.5g 1g, 0.5g/100ml y para la combinación de ambas sustancias 20g/2g, 15g/1.5g, 10g/1g, 5g/0.5g/ 100ml y un grupo control para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se utilizó el análisis estadístico de varianza (ANOVA). Los resultados fueron: el

efecto antibacteriano de *Erythroxylum coca* para la CMI (5g/100mg) presento un promedio de 18.33 colonias de *S.mutans* y 55.33 colonias de *A. actinomycetemcomitans*;siendo; siendo *S.mutans* más sensible que el *A. actinomycetemcomitans* al mostrar menor cantidad de colonias. La CMI de la solución de llipta para *S. muntans* fue de 0.5g/5ml con promedio de 32.33 colonias y para *A. actinomycetemcomitans*; 0.5g/5ml con promedio de 59.67 colonias. La CMI de la combinación del extracto de *erythroxylum coca* y llipta para *S. mutans* fue de 5g/0.5g/ml *actinomycetemcomitans* con promedio de 37.67 colonias y para *A. actinomycetemcomitans* fue 5g/ 0.5/100ml con promedio de 83.33 de colonias. El extracto de presento mayor efecto antibacteriano en comparación con la solución llipta y la combinación del extracto de *Erythroxylum coca*- llipta.¹¹



CAPITULO II

MARCO TEÓRICO, HIPÓTESIS Y OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN



2.1 MARCO TEORICO

2.1.1 *Streptococcus mutans*

Los estreptococos son cocos grampositivos dispuestos en cadenas de 4 a 10 cocos, los cuales miden de 0.5 a 0.8 μm de diámetro, anarobios facultativos, comprenden parte de la flora microbiana residente de la cavidad oral y las vías respiratorias altas, son patógenos oportunistas enfermedades como la caries dental y la endocarditis infecciosa entre otras. Su principal hábitat es la superficie dentaria del hombre, pero también puede ser inidentificable en las fauces. Su presencia en la placa bacteriana se ve favorecida por el alto nivel de sacarosa en la dieta.¹¹

Desde el punto estructural, no difieren del modelo general de todos los estreptococos, salvo en la ausencia de la capsula, polisacárido C, complejos fibrilares y las fibras que cuando existen, no son muy prominentes. Por el contrario, en la pared destacan proteínas dotadas de diversas funciones, y polisacáridos, distintos del C. estos polisacáridos muestran distintas especificidades antigénicas, lo que permite distinguir los serotipos a,b,c,d,e,f,g,h.¹²

Los *Streptococcus* de grupo *mutans* son acidogénicos, por lo cual sobreviven y se desarrollan a un pH bajo, y acidúricos o capaces de seguir produciendo ácido en un pH bajo. Estas especies bacterianas consiguen alcanzar rápidamente el pH crítico necesario para iniciar el proceso de desmineralización. El potencial ácido génico, acidúrico es importante en su virulencia. Este microorganismo produce ácido láctico a partir de la sacarosa y otros hidratos de carbono con mayor rapidez que otras bacterias bucales. El ácido láctico es fundamental en la virulencia, debido a que es el ácido más potente que interviene en la desmineralización del diente.¹²

La temperatura óptima de crecimiento es de 36 °C. Su metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que descienden mucho el pH, lo que obliga a utilizar medios amortiguados para evitar su muerte. El crecimiento en caldo es variable, desde turbidez homogénea a granular, pasando por formas en cometas y depósitos en el fondo o en las paredes.¹³

2.1.1.1 Taxonomía

El *Streptococcus mutans* y su taxonomía:

Dominio: Bacteria

Filo : Firmicutes

Clase : Bacilos

Orden : Lactobacillales

Familia : Streptococcaceae

Especie : *Streptococcus mutans*.¹⁴

2.1.1.2 Estructura

Desde el punto de vista estructural, y dependiendo de las especies, pueden distinguirse, además del núcleo, el citoplasma, la membrana citoplásmica y la mureína, otros elementos de gran interés.⁴

- **Ácidos teicoicos y lipoteicoicos.** Íntimamente asociados a la mureína, tienen carácter antigénico y los segundos, ya sea individualmente o formando un entramado fibrilar asociándose a proteínas parietales superficiales y fimbrias, intervienen en procesos de adhesión. Esta estructura fibrilar se produce por interacciones iónicas entre los ácidos lipoteicoicos y las moléculas proteicas.⁴
- **Carbohidratos parietales.** Embebidos y situados por fuera de la mureína, también tienen carácter antigénico, e intervienen en procesos de adhesión, agregación y coagulación bacteriana.⁴
- **Proteínas parietales.** Localizadas por fuera de la cubierta anterior, aunque también pueden encontrarse intercaladas en la misma o en la mureína. Tienen distinta función: unas poseen carácter antigénico, de forma independiente o asociadas a los ácidos lipoteicoicos y fimbrias; otras muestran una acción enzimática como glucosil y fructosiltransferasas; otras se comportan como adhesinas, individualmente o formando los complejos ya señalados, o actúan como fijadoras a la película adquirida y como receptoras de glucanos. Por todo

lo expuesto, desempeñan un importante papel en la colonización tisular del hospedador, y especialmente en la formación de placas dentales.⁴

- **Fimbrias.** También intervienen en el proceso de adhesión a tejidos del hospedador y en la agregación y coagregación entre las bacterias.⁴
- **Cápsula.** Puede estar constituida a expensas de ácido hialurónico o polisacáridos.⁴
- **Glicocálix.** Constituido por glucanos o fructanos, o ambos, son de gran importancia en la adhesión, especialmente en la formación de placas dentales.⁴

2.1.1.3 Cultivo

Son anaerobios facultativos. La temperatura óptima de desarrollo es de 36 ± 1 °C. Aunque pueden multiplicarse al aire, una práctica aconsejable consiste en incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y, posteriormente, otras 24 horas en aerobiosis; esto favorece la formación de agua oxigenada, que es un importante carácter diferencial y, en parte, la síntesis de polisacáridos extracelulares que, en algunos casos, pueden facilitar el reconocimiento de las colonias.⁴

En agar sangre de carnero son α o γ hemolíticos, con excepción de algunas cepas de *Streptococcus mutans* que son β hemolíticas. Como medio poco selectivo puede usarse MSA (mitis-salivarius-agar) que contiene un 5% de sacarosa y, como sustancias inhibitoras, telurito potásico, azul tripán y cristal violeta. Como medio más selectivo, el usado habitualmente es MSB (mitis-salivarius-bacitracina), que es MSA al que se añade 0,2 U/ ml de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100. Este medio está considerado, por algunos autores, como un inhibidor del serotipo α (*Streptococcus cricetus*); pese a que esta especie es muy poco frecuente en la cavidad oral humana, se han desarrollado otros medios de cultivo que no tienen este hipotético inconveniente, como es el caso del agar TYCSB (con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina). Las colonias en MSA y MSB aparecen elevadas, convexas, onduladas, opacas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas, y con una burbuja de color brillante rodeándolas cuando producen polisacáridos extracelulares. Sin embargo, tanto en estos medios como en el agar TYCSB, el aspecto de las colonias puede variar mucho no sólo entre las especies, sino

también entre cepas de la misma especie, este hecho a menudo dificulta su reconocimiento.⁴

Metabolismo de la sacarosa

El sustrato más importante para estos microorganismos, con respecto a su papel como agentes etiológicos de las caries, es la sacarosa. De su metabolización derivan la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares.⁴

En presencia de sacarosas el *Streptococcus mutans* produce un glucano extracelular, polímero de la glucosa, que le permite establecer sobre la superficie dentaria y forma una placa adhesiva sumamente criogénica. El *Streptococcus mutans* es ácido génico y acidúrico, y este es el aspecto más importante de su probable potencial cariogénico.⁴

Solo una pequeña parte de la sacarosa es derivada para la formación de polisacáridos extra e intracelular; la mayor parte de ella se emplea como fuente energético para el desarrollo de estos estreptococos.¹⁵

2.1.1.4 Patogenia

Streptococcus mutans son patógenos oportunistas en enfermedades como la caries dental y en la endocarditis infecciosa entre otras. Su principal habita es la superficie dental del hombre, pero también puede ser identificados en las fauces. Su presencia en la placa bacteriana se ve favorecida por el alto nivel de sacarosa en la dieta.¹⁴ Una de las propiedades de virulencia importantes de estos organismos es su capacidad de formar biopelículas conocidos como placa dental sobre la superficie de los dientes.¹⁴

2.1.2 Porphyromonas gingivalis

Es un cocobacilo gran negativo, anaerobio obligado, no móvil. Esta especie presenta una elevada correlación con la progresión de la enfermedad, severidad y pérdida de hueso. Produce un gran número de factores de virulencia: enzimas (hidrolíticas, proteolíticas, lipolíticas, y tripsina), otras proteínas y producen terminales de su metabolismo que son activos frente a un amplio espectro de proteínas y productos terminales de su metabolismo que son activas frente a un amplio espectro de proteínas de huésped. Posen un mecanismo de evasión para las defensas del hospedador, lo que favorece la progresión de la enfermedad.¹⁵

Otro factor es la capacidad de adherencia a una diversidad de tejido y células del hospedador, la habilidad y multiplicación. Las fibras se comportan como adhesinas y posibilitan a *p. gingivales* la adherencia y la congregación especialmente observada entre *Porphyromonas gingivalis* y *fusobacterium nucleatu*, microorganismos considerados subgingival.

Cuando *Porphyromonas gingivalis* de invasión para la defensa del hospedador, lo que favorece la progresión de la enfermedad.¹⁵

2.1.2.1 Taxonomía

Dominio : Bacteria

Filo : Bacteroidetes

Clase : Bacteroides

Orden : Bacteroidales

Familia : Porphyromonadaceae

Género : Porphyromonas,

Especie : Porphyromonas gingivales.¹⁶

2.1.2.2 Estructura

Porphyromonas gingivalis es un bacilo corto o cocobacilo, que mide de 0.5 - 0.8 um x 1 - 3.5 um²¹ anaerobio estricto, gram negativo, siendo considerado un comensal en la cavidad oral.¹⁵

Su pared celular presenta a nivel de la membrana externa las endotoxinas (neuraminidasa, enzimas tripsicas), son capsulados, no esporulados, sin flagelos y abundantes fimbrias de diferentes tipos.¹⁴ A nivel superficial presenta vesículas que contienen una variedad de enzimas que juegan un rol importante en su virulencia. Así también produce múltiples enzimas con capacidad de degradar compuestos proteicos.¹⁷

2.1.2.3 Cultivo

Porphyromonas gingivalis es una especie proteolítica, a sacarolítica, anaerobia estricta, por lo que coloniza sitios en donde la tensión de oxígeno es baja, pero en los cuales hay substratos abundantes en nitrógeno. El ecosistema subgingival proporciona un medioambiente ideal para esta especie, ya que, el potencial redox es bajo (y más bajo aun en sacos periodontales), y posee nutrientes endógenos ricos en péptidos y aminoácidos.¹⁸

Porphyromonas gingivalis tiene un requerimiento obligado de hierro para crecer. Sin embargo, cuando ocurre una falta de hierro en el sistema de poros de la bacteria (sideporos, los cuales quelan hemina) utiliza hemina (hierro protoporfirina IX). Los niveles de hemina en boca son variables y el sangramiento, como resultado de la inflamación gingival, elevaría su concentración subgingival, de modo que este puede ser un factor que predispone a la acumulación de esta bacteria. La hemina que se acumula en la membrana extracelular actúa como "basurero" de oxígeno ayudando a mantener un microambiente anaerobio.¹⁹

2.1.2.4 Patogenia

Se ha demostrado que LPS de esta especie induce la producción de IL-6 e IL-8 desde fibroblastos del ligamento periodontal en humanos. Las evidencias indican que LPS de *Porphyromonas gingivalis*, especialmente su lípido A, es capaz de estimular la respuesta inflamatoria del hospedero indirectamente a través de la producción de citocinas.¹⁹

Porphyromonas gingivalis produce un gran número de enzimas, proteinasas y productos finales de su metabolismo que son activos contra un amplio espectro de 23 proteínas del hospedero, y está provista de mecanismos para evadir las defensas de este. Dichos compuestos corresponden a inhibidores de proteinasas, inmunoglobulinas, proteinasas que contienen hierro, proteínas bactericidas, proteínas de matriz extracelular, y proteínas íntimamente envueltas en funciones fagocíticas, tales como fijación de complemento y coagulación. La mayoría de las actividades enzimáticas de *Porphyromonas gingivalis* son asociadas a la proteinasas cisteína, la cual le proporciona ventajas metabólicas, ya que le otorga la capacidad de utilizar largas proteínas del hospedero para su crecimiento y desarrollo.²⁰

Una de las características de virulencia significativas de *Porphyromonas gingivalis* es este gran número de enzimas hidrolíticas, proteolíticas y lipolíticas, que son producidas esencialmente por todos los tipos de *Porphyromonas gingivalis* conocidos. Varias de estas proteinasas asociadas a *Porphyromonas gingivalis* (capaces de hidrolizar péptidos unidos) parecen ser funcionalmente importantes en el medioambiente in vivo. Estos factores de virulencia in vivo, si actúan en el hospedero, pueden jugar un rol significativo en la progresión de la periodontitis.²⁰

Dentro de las proteinasas de *Porphyromonas gingivalis* se consideran a las colagenasas y a las aminopeptidasas como críticas en la patogénesis de la bacteria. Existen proteinasas específicas como arginina y lisina proteinasas, producidas por *Porphyromonas gingivalis*. Son proteinasas cisteínas, y han recibido un nombre en común, gingipains. Estas son un potente regulador de la permeabilidad vascular, siendo capaces de inducir la permeabilidad vascular en plasma humano y unirse directamente a bradiquininas. Además, se consideran quimiotácticas para polimorfonucleares. Arg-gingipain es capaz de inactivar especies de oxígeno reactivas (bactericidas naturales) producidos por polimorfonucleares, el cual es un importante mecanismo en la defensa del hospedero.

Porphyromonas gingivalis. Son proteinasas cisteínas, y han recibido un nombre en común, gingipains. Estas son un potente regulador de la permeabilidad vascular, siendo capaces de inducir la permeabilidad vascular en plasma humano y unirse directamente a bradiquininas. Además, se consideran quimiotácticas para polimorfonucleares. Arg-gingipain es capaz de inactivar especies de oxígeno reactivas (bactericidas naturales) producidos por polimorfonucleares, el cual es un importante mecanismo en la defensa del hospedero.²⁰

Existen unas proteínas bacterianas que actúan como factor de virulencia llamadas hemaglutininas. *Porphyromonas gingivalis* produce a lo menos cinco de ellas. Cuando se expresan en la superficie bacteriana, pueden promover la colonización mediante la unión de bacterias a receptores (usualmente oligosacáridos) en células humanas. Existe una relación entre la capacidad de hemaglutinación y la actividad proteolítica de *Porphyromonas gingivalis*, lo que se ha dilucidado mediante análisis genéticos.¹⁹

2.1.2.5 *Porphyromonas gingivalis* y su relación con la periodontitis

Una de las patologías más comunes en la cavidad oral es la periodontitis, la cual presenta una etiología bacteriana predominante, siendo entre ellas, las que más destacan *Porphyromonas gingivalis*, *Actinomycetemcomitans*, *Prevotella* intermedia, *Treponema denticola*, que son considerados como el grupo agresivo en la lesión. Pero la *Porphyromonas gingivalis* la predominante en esta patología. En el Perú, según MINSA, la enfermedad periodontal, presenta una prevalencia de 85-87 %, no habiendo reportes de la periodontitis crónica, la cual se presenta en personas por encima de los 40 años. La bacteria una vez que llega a su habitat, se condiciona al medio para vivir en condiciones de óxido reducción negativa, así como por su diversidad de factores de virulencia, rompe la homeostasis en el surco, generando una destrucción continua y agresiva de los tejidos de sostén del diente, llegando a degradar hueso y tejidos blandos. Esta destrucción va a generar signos clásicos como enrojecimiento perisulcular, la profundidad del surco gingival, sangrado al estímulo, movilidad de diversos grados, que con la cronicidad de la lesión puede perderse la pieza dentaria.²¹

2.1.3 Plantas medicinales

EL empleo de las plantas medicinales como tratamiento de diversos males, se registran desde tiempos muy remotos basándose en creencias populares y conocimientos tradicionales, transmitidos de generación en generación. Hoy en día, muchas propiedades terapéuticas de diversas plantas han sido demostradas científicamente en base de su extracción de sus principios activos, con diversas actividades biológicas.²²

Las propiedades antibacterianas encontradas en algunas plantas se explican por las sustancias terpenoides presentes en la fracción del aceite esencial extraída. También existen reportes de actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, de los aceites esenciales de diversas plantas.²³

Minthostachys mollis, nombre científico de la muña, planta nativa que crece en diversas zonas de la serranía peruana.

Otros nombres vulgares con los que se les conoce a esta planta son:

Muña negra, coa hembra, polco silvestre, “coz,muña- muña,huchay”, “arash muña,” “kon, orcco muña”.²²

2.1.3.1 Características del genero *Minthontanchy mollis* (MUÑA)

La “Muña” planta oriunda de los valles andinos del Perú y Bolivia, cuyas especies pertenecen a la familia de las labiadas o laminaces, genero *minthostaschys*.²²

Son arbustos aromáticos ampliamente extendidos en las zonas andinas. Trepadores o de ramas amplias con flores pequeñas dispuestas de forma variada. Las brácteas algunas veces son foliáceas. El cáliz es tubular con 13 nervaciones, con 5 dientes de forma deltoides angosta y el cuello es velludos- anillado. La corola es de forma tubular, a veces con 6 mm de longitud con 2 lóbulos altos y bajos. Presenta estambres pequeños a la mitad del tubo colorar, en su mayoría un poco debajo de la corola.²¹

Se puede encontrar entre 2500 a 3500m.s.n.m. crecen en forma abundante y silvestre en los valles de la sierra central peruana, en lugares aledaños a las acequias, no presentando requerimientos tan intensos por el agua por lo que pueden desarrollarse en las laderas de los cerros. Se distribuyen mayormente en el sur del Perú: Cuzco, Puno, Ayacucho, Apurímac entre 2500 a 2700 m.s.n.m.²²

Según Munguia. Se puede encontrar a lo largo de la costa y la cordillera andina de 500 a 3500 m.s.n.m. distribuidas desde, Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia y argentina.²³

De este género existen 12 especies, de los cuales, 6 han sido reconocido en el Perú siendo una de las más importantes *Minthontanchy mollis*, *M. glabesan*, *M. setosa*, *M. spicata*, *M. griseb* y *salisifolia*. Todas generalizadas con el nombre local de muña.²⁴

2.1.3.2 Taxonomía

La muestra vegetal en estudio fue clasificada en el museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el Biólogo Hamilton Beltrán S., según el sistema de clasificación de Engler & Prantl, modificado por Melchor en 1964:⁴

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Sub clase : Methachlamydeae

Orden : Tubiflorae

Familia : Lamiaceae (Labiatae)

Género : Minthostachys

Especie : Minthostachys mollis

Nombre vulgar : “Muña”

Fórmula floral : $K (5) C (2-3) A (2-2) G (2)$.²¹

2.1.3.3 Características botánicas del género en estudio

La muña es un arbusto que alcanza una altura de 0.9 a 1.5 metros, siendo bien tupido en las hojas, las mismas que son opuestas y aserradas. Pecioladas, presentando pelos en los peciolos y en la cara inferior de las hojas, en las cuales se deposita la mayor cantidad de esencia. El tallo también presenta pelos, tiene forma prismática, cuadrilátera y propensa a la lignificación. Las flores se encuentran en la parte superior de las ramas reunidas en verticilos falsos.²³

Las flores son actinomorfas con cáliz y corola pentámera, androceo y 4 estambres, gineceo superior formado por 4 lóbulos y un estilo bifido, semillas de 0.5 a 1 mm de largo y de color marrón.²³

2.1.3.4 Aspecto botánico de la especie en estudio

Pertenece a la familia de las lamiaceas o lamiaceae, constituida por 300 especies distribuidas en 20 géneros de las plantas herbáceas como la menta, hierba buena, matitas como tomillo o arbusto como romero, muchas de estas especies producen aceites esenciales de manera tan preferente que pueden considerarse plantas aromáticas por excelencia, usadas en la medicina tradicional industria farmacéutica y perfumería.²⁴

En la familia comprende plantas arbustos, perennes, de olor característico y llegan a tener aproximadamente 1,5 metros de altura. Los tallos son semileñosas, cuadrangulares, angulosas y muy pubescente, con abundantes pelos granulosos y pelos tectores. Además es muy ramificado. Las hojas son simples, opuestas, decusadas, pecioladas, cordiformes, penniversas, dentadas, asimétricas en la base, pubescentes en el haz y envés (pelos gránulos y tectores). Las inflorescencias son racinosas, constituidas por racinos terminales y axilares en las cuales las flores se ubican en

grupos de 3 a 4 en formas opuestas y verticiladas. Las flores son pentámeras, tubulosas, homoclamídeas, zigomorfas, pedunculadas, bilabiadas y hermafroditas. El cáliz es pentámeros, gamopatala, bilabiada, de color azul o blanco, constituido con 5 pétalos concrecentes de los cuales 3 forman el labio inferior y 2 el labio superior, externamente pubescentes.²⁴

Androceo está constituido por 2 estambres concrecentes por sus filamentos al labio inferior en su parte central interna. En cada estambre sus conectivos se han desarrollado llevando hacia la parte superior de la corola una teca fértil de cada uno y hacia la parte interna las otras 2 tecas infértiles y con crecentes formando el sistema de palanca que facilita la polinización entomógama.²³

El gineceo es completo de ovario supero, sentado sobre un rodete nectarifero que tiene una glándulas nectarios desarrollada aun extremo, tetracarpelar, tetra ocular, tetraovular. Esto ginobásico, desarrollado, pubescente y azulado en la parte superior, divide al ovario en 4 mericarpios o folículos, cada uno de las cuales albergan un ovulo anatropo de la placentación basal. Estigma bificado y azulado. El fruto es folículo constituido por 4 mericarpios.²⁴

2.1.3.5 Composición Química de la especie *Minthontanchy mollis*

Con respecto a la composición química del aceite esencial de *Minthontanchy mollis* (muña) existen pocos trabajos de investigación por lo que se tiene poca información; el aceite esencial de *Minthontanchy mollis* (muña), al igual que otros aceites esenciales, presenta una estructura aldehídica, cetónica, alcohólica (mentol y mentona), ésteres, éteres y terpenos en mayor porcentaje.²⁷

Gibaja²⁵ realizó la desterpenación del aceite esencial de *Minthontanchy mollis* (muña) determinando el 10.20% para la parte desterpenada (compuestos oxigenados) y 89.80 % para la fracción terpénica. **Chica**²⁶ determinó la presencia de carvacril acetato, carvacrol, pulegona y mentona.

2.1.3.6 Moléculas presentes en el Aceite esencial de *Minthostachys mollis*

Pulegona.-Uno de los componentes más importantes de muchos aceites *Minthostachys*, pero es mejor conocido por pulegium poleo (*Mentha*). Es altamente tóxico en grandes cantidades, daña el hígado y puede provocar el aborto. Su toxicidad probablemente explica algunos de los efectos del aceite de *Minthostachys* contra las plagas y parásitos. La sustancia también se usa en perfumería y saborizantes.²⁷

Mentona.-Otro componente muy importante, junto con Pulegona a menudo representa más del 75% de la composición del aceite entero. El más conocido de la menta (*Mentha x piperita*). Tiene un aroma muy agradable sabor a menta y se usa en perfumería, pero también tiene propiedades digestivas.²⁷

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

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

Mentol.-Por lo general, mucho menos importante en *Minthostachys mollis*, pero a veces se encuentra como componente menor de la mezcla de aceite. Adormece el dolor, y se utiliza contra dolor.²⁷

Linalol.- Empleado como condimento y como insecticida, linalol es más conocido de cilantro (*Coriandrum sativum*) de la familia Apiaceae. A menudo es uno de los componentes menores del aceite de *Minthostachys mollis*.²⁷

Timol.-Como su nombre lo sugiere, esta sustancia es bien conocida de los aceites de distintas especies de tomillo. Actúa como antiséptico y contra el dolor de garganta y tos. A veces se encuentra como un componente menor en el aceite de *Minthostachys mollis*.²⁷

2.1.3.7 Usos y aplicaciones de *Minthontanchy mollis*

La muña es conocida por la gente del pueblo por sus propiedades digestivas cólicos flatulencias, vómitos, diarrea anti fúngica, antiasmática expectorantes, antiespásticas, antiséptica, analgésico, antiinflamatorio, febrífugas, en el tratamiento de los tumores y mezclándole con chilca se empleaba en fracturas. Es excelente contra la halitosis y para jaquecas y soroques.

Además es utilizada como condimentos para preparar platos típicos.

En el campo agrícola se emplea para la preservación de algunos productos como la papa, del ataque de insectos, a manera de fumigante orgánico vegetal contra el gorgojo de los andes y morimoschima y como anti moho.

En el campo pecuario es utilizado para controlar los ectoparásitos de los animales domésticos, además para curar sarna en equinos y camélidos en otras zonas de latinoamericana, principalmente en argentina, se le emplea para aromatizar y fabricar licores y bebidas.

La composición de la muña es: aceite esencial, glucósidos, mucilagos, saponinas, taninos, alcaloides y esteroides. Además contiene carbohidratos, calcio, fosfato, fiero, trazas de vitamina B1, esencias y mentón.²²

2.1.4 Aceites Esenciales

2.1.4.1 Definición

Los aceites esenciales son compuestos vegetales que debido a su consistencia son muy volátiles y de olor intenso. Se incluyen dentro de este grupo solamente aquellas especies de plantas medicinales que las contienen en concentraciones elevadas, entre 0,1 y 10 %.

28

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Se trata de productos químicos intensamente aromáticos, no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por

exposición al aire. El término aceite esencial se aplica también a las sustancias sintéticas similares preparadas a partir del alquitrán de hulla, y a las sustancias semisintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales.²⁹

Los aceites esenciales son llamados así por ser constituyentes odoríferos o aceites de una planta, la palabra esencial deriva del latín “quinta essentia”, que significa quinto elemento, propuesto por Celso, quien pensaba que esta era el elemento efectivo en una preparación médica.³⁰

Son ligeramente volátiles y la mayoría de ellos tienen un olor característico, a veces aromático. Son apenas solubles en el agua, pero se volatilizan fácilmente con vapor de agua. Proporcionan efectos estimulantes en la piel y mucosas, son expectorantes y laxantes, así pues todas las plantas que contienen aceites esenciales suelen utilizarse en las enfermedades de boca y garganta, aunque también sirven de tónicos digestivos y estimulantes del apetito, y se emplea también como condimento.³¹

2.1.4.2 Propiedades de los Aceites Esenciales

Color: Casi todos los aceites esenciales son incoloros en estado puro y frescos; ante la exposición al aire adquieren diversos colores.

Olor: El olor de los aceites volátiles es muy variable es su propiedad más característica. El olor de un aceite es muy sensible ante la exposición al aire.

Sabor: Son tan variables como sus olores. Algunos tan dulces, otros tienen sabores suaves, picantes, ácidos, cáusticos o ardientes.

Densidad: La densidad de los aceites esenciales varía (entre 0.842 y 1.172 g/ml); casi todos son más livianos que el agua.

Deterioro: La exposición a la luz y al aire deteriora la calidad y destruyen la fragancia de los aceites esenciales. Se deben conservar en botellas de color ámbar bien llenas, tapadas y colocadas en lugar fresco.

Solubilidad: Son solubles a solventes orgánicos como alcohol, el éter, el cloroformo, el benceno y muchos otros.³²

2.1.4.3 Composición química de los aceites esenciales de las plantas

Los constituyentes de los aceites esenciales principalmente son terpenoides. Los compuestos terpenos proceden de la condensación del isopropeno y pueden o no tener oxígeno. Los que carecen de oxígeno son hidrocarburos: monoterpenos y sesquiterpenos. Que pueden ser aromáticos y alifáticos. Está estimado que hay más de 1000 estructuras de monoterpenos y 3000 sesquiterpenos. Compuestos oxigenados derivados de estos hidrocarburos son terpenos funcionalizados con función alcohol, fenol, aldehído, cetona, éter o peróxido. Otros componentes pocos frecuentes en los aceites esenciales: compuestos alifáticos y aromáticos no terpenoides, como fenil propano des, compuestos nitrogenados y azufrados.³³

La volatilidad y el marcado olor de los aceites esenciales, constituyen los elementos de la comunicación química en la polinización y en la dispersión de las diásporas. A menudo, constituyen un medio de defensa frente a depredadores (microorganismos, hongos, insectos, herbívoros); estas acciones se facilitan por la localización periférica de los efectos secretores.³⁴

Los monoterpenos y sesquiterpenos de 10 y 15 átomos de carbonos derivados de geranilpírofosfato (GPP) y farnesilpírofosfato (FPP) respectivamente. De acuerdo con su estructura se les clasifica según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos.³⁵

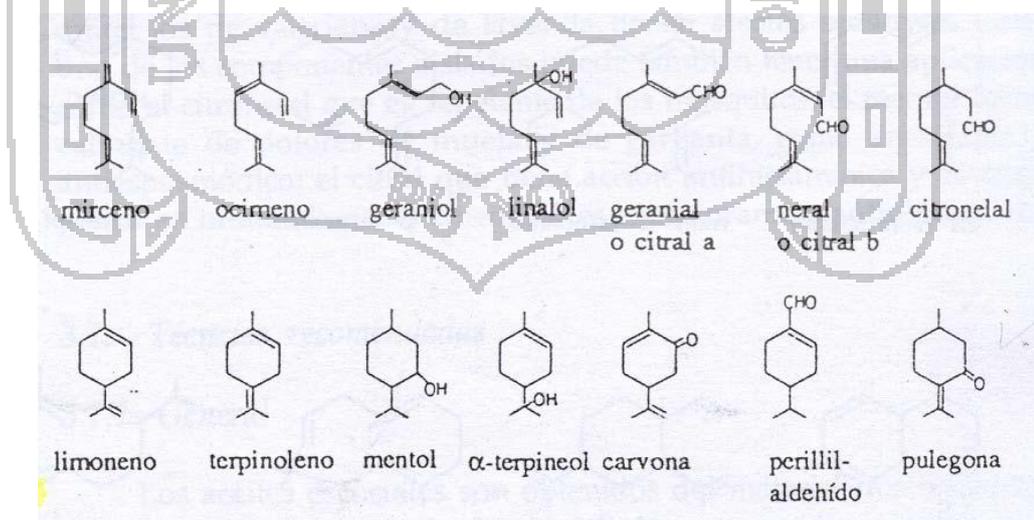


fig. N° 1. Monoterpenos

- a) **Monoterpenos.-** Los terpenos de función aldehídos se hallan distribuidos ampliamente en las plantas especialmente valiosas por sus propiedades aromáticas y considerándose un índice de calidad en el valor de los aceites esenciales, muchos de los monoterpenos experimentan cierre de anillo produciendo ácidos cíclicos insaturados. Los principales monoterpenos responsables del aroma son alcoholes y aldehídos.
- b) **Sesquiterpenos.-** Los sesquiterpenos tienen propiedades débiles y son menos volátiles, tienen una densidad aproximada de 0.9 g/ml, su viscosidad es mayor que la de los monoterpenos.³⁶
- c) **Fenilpropanos.-** Los fenilpropanos son sustancias naturales ampliamente distribuidas en los vegetales caracterizados por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikimico.³⁶

2.1.4.4 Extracción de los Aceites Esenciales

Expresión del pericarpio: Una bandeja con pinchos, en cuya parte inferior hay un canal para recoger el aceite esencial. Se emplea para cítricos sobre todo.

Disolución en grasa (*enfleurage*): Los aceites son solubles en grasas y alcoholes de alto %. Sobre una capa de vidrio se coloca una fina película de grasa y sobre ella los pétalos de flores extendidas. La esencia pasa a la grasa, así hasta saturación de la grasa. Posteriormente con alcohol de 70°, se extrae el aceite esencial. Se emplea para flores con bajo contenido en esencias pero muy preciadas (azahar, rosa, violeta, jazmín).³⁵

Extracción con disolventes orgánicos: Que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo 23 rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato. Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70 °C, que se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua. Se emplea

cuando hay componentes de peso molecular elevado que no son lo suficientemente volátiles.³⁴

Extracción con gases en condiciones supercríticas: Se emplean gases, principalmente CO₂, a presión y temperatura superiores a su punto crítico. En esas condiciones se obtienen buenos rendimientos y se evitan alteraciones de los componentes de la esencia. La infraestructura necesaria es cara, pero tiene sus ventajas, como la fácil y rápida eliminación del gas extractor por descompresión, la ausencia de residuos de disolventes y que los gases no resultan caros.³⁷

2.1.5 Destilación por arrastre de vapor

Las plantas se colocan sobre un fondo perforado o criba ubicado a cierta distancia del fondo de un tanque llamado alambique. La parte más baja de esta contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El calentamiento se produce con vapor saturado que se provee de una fuente de calor que compone el equipo, fluye mojado y a presión baja, penetrando a través del material vegetal. Los componentes se volatilizan, y condensan en un refrigerante, siendo recogidos en un vaso florentino, donde se separa el agua del aceite por diferencia de densidad.³⁴

2.1.6 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima cantidad de antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Es el método habitual utilizado en los laboratorios de Microbiología Clínica.¹¹

Existen diferentes técnicas de laboratorio que permiten medir o calcular de forma rutinaria, y de manera semicuantitativa, las CIM (métodos manuales y métodos automatizados o semiautomatizados). Se puede realizar mediante:

- a) Difusión en agar: Disco placa y E test.
- b) Dilución: Medio sólido y Medio líquido (microdilución, macrodilución)
- c) Mecanizados y Automatizados.¹¹

2.1.6.1 Métodos de dilución

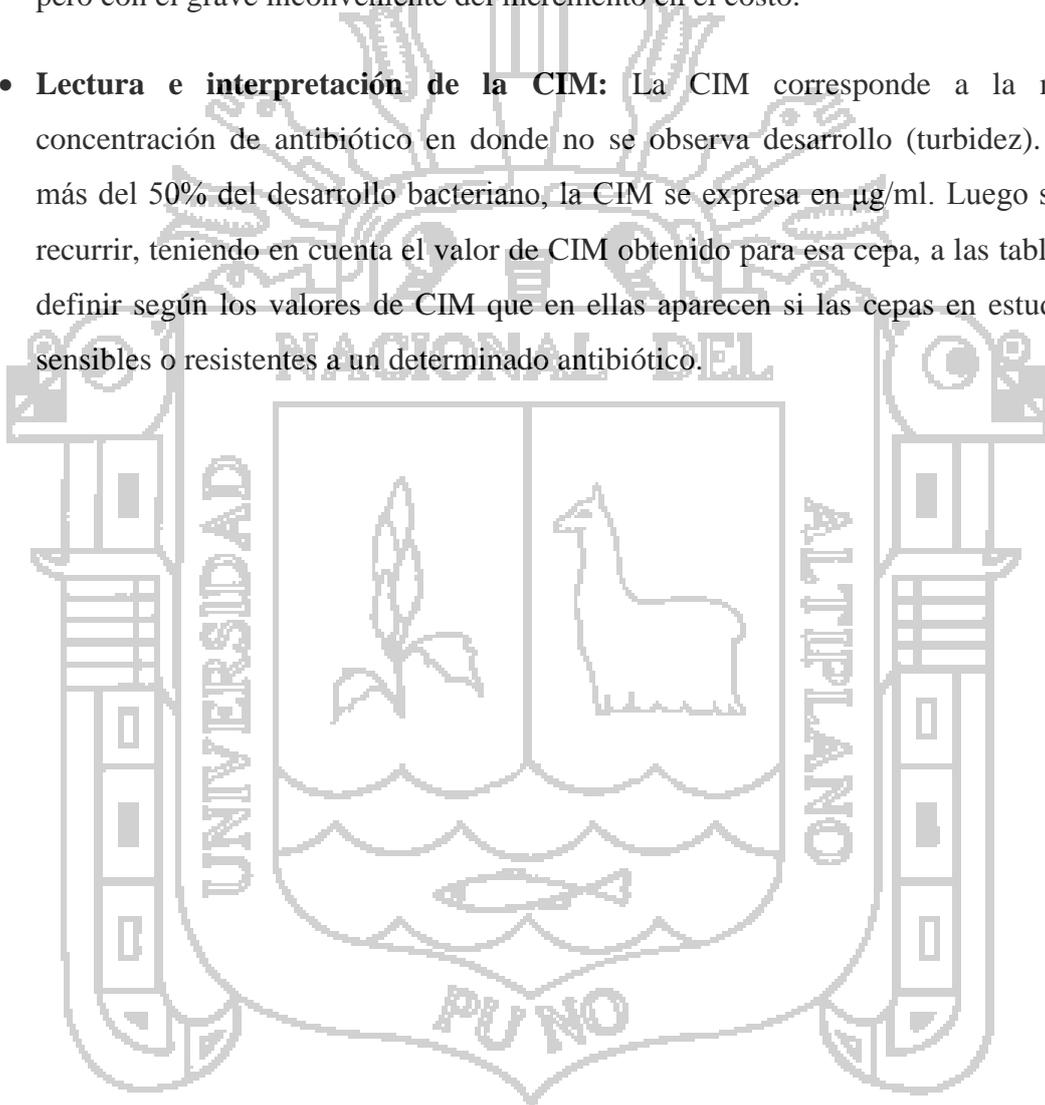
Las primeras determinaciones se realizaron empleando una cantidad considerable de tubos con caldo de cultivo, a los cuales se le colocaban diluciones crecientes de antibióticos con el mismo fundamento que el descrito para el método de dilución en agar. Este procedimiento se denominó macrodilución en caldo. Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución en caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas semiautomáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento de su costo. Dentro de estos describiremos la macrodilución en caldo.¹¹

- **Macrodilución en caldo:** Las pruebas de dilución han sido utilizadas durante años. Los procedimientos iniciales eran realizados en tubos de ensayo grandes (13 por 100 mm) con volúmenes de caldo de por lo menos 1 ml. Este método fue estandarizado en la década de los años 70 por el Estudio Cooperativo Internacional y luego la NCCLS publicó un estándar del método. Este método es llamado macrodilución en caldo. A partir de los años 60 se comenzaron a utilizar dispositivos serológicos para dispensar y diluir. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como microdilución en caldo.¹¹
- **Microdilución:** Los métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio

sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida.¹¹

La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi) automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el costo.¹¹

- **Lectura e interpretación de la CIM:** La CIM corresponde a la mínima concentración de antibiótico en donde no se observa desarrollo (turbidez). Inhibe más del 50% del desarrollo bacteriano, la CIM se expresa en $\mu\text{g/ml}$. Luego se debe recurrir, teniendo en cuenta el valor de CIM obtenido para esa cepa, a las tablas para definir según los valores de CIM que en ellas aparecen si las cepas en estudio son sensibles o resistentes a un determinado antibiótico.



2.2 MARCO CONCEPTUAL

Concentración mínima inhibitoria (CMI). Es la menor concentración de antimicrobiano expresada en g/ml, que inhibe el crecimiento visible de un inóculo bacteriano, en un cultivo estandarizado

Efecto Farmacológico. Es el cambio final de la acción farmacológica, a través de una serie de pasos intermedios

Acción Farmacológica. Es la combinación inicial del fármaco con su receptor, que determina un cambio de conformación de este (agonistas) o impide el cambio de conformación por exclusión de este (antagonista)

Antibacteriano. Son sustancias químicas que evitan el crecimiento o destruyen a los microorganismos invasores del cuerpo humano.

Efecto antibacteriano. Es la inhibición del crecimiento o reproducción bacteriana debido a algún proceso.

Antiséptico. Es todo agente, la mayoría de veces químico, que impide el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, sin que signifique necesariamente destruirlos.

Monoterpenos. Son mejor conocidos como componentes de las esencias volátiles de las flores y como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, en los que ellos forman parte de hasta el 5 % en peso de la planta seca.

Taxonomía. Estudia las relaciones de parentesco entre los organismos y su historia evolutiva.

Mecanismo de acción. La acción farmacológica es aquella modificación o cambio o proceso que se pone en marcha en presencia de un fármaco.

Patogenia. Conjunto de mecanismos biológicos, físicos o químicos que llevan a la producción de una enfermedad.

Aceite esencial. Líquido oleoso, volátil, generalmente insaponificable, algo soluble en etanol, cloroformo y aceites fijos; contiene terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácido, aldehídos, éteres.

Unidades formadoras de colonia. Es un valor que indica el grado de contaminación microbiológica de un ambiente. Expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un metro cúbico de agua.

2.3 HIPÓTESIS

2.3.1 Hipótesis General

El Aceite Esencial del *Minthostachys mollis* (Muña) tiene efecto Inhibitorio frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. PUNO-2013.

2.3.2 Hipótesis Específicos

- El Aceite Esencial del *Minthostachys mollis* (Muña) a la concentración de 0.336g/ml, inhibe el crecimiento bacteriano frente a *Streptococcus mutans*.
- El Aceite Esencial del *Minthostachys mollis* (Muña) a las concentración de 0.336g/ml, Inhibe el crecimiento bacteriano frente a *Porphyromonas gingivalis*.
- Existe diferencia significativa entre la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo General

Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (Muña) frente a la actividad bacteriana del *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Puno-2013

2.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacterianas de *Streptococcus mutans* a las concentraciones de 0.056g/ml, 0.112g/ml, 0.0224g/ml, 0.336g/ml, 0.448g/ml.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* en 0.056g/ml, 0.112g/ml, 0.0224g/ml, 0.336g/ml, 0.448g/ml.
- Comparar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.





3.1 DISEÑO DE ESTUDIO

Es una investigación experimental de diseño cuasi experimental de tipo descriptiva

3.2 MUESTRA DE INVESTIGACIÓN

- Aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña)

Cepas de:

- *Streptococcus mutans*
- *Porphyromonas gingivalis*

Proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana-UNA (Anexo 01)

3.3 INSTRUMENTO

Ficha de recolección de datos (Anexo 02)

3.4 TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Técnica: observación

3.5 RECOLECCIÓN DE DATOS

3.5.1 Primera Etapa

Recolección del material vegetal

Para recolectar la muña se hizo el estudio de identificación taxonómica de la planta, una vez identificada el género y especie de la planta, se procedió a recolectar el *Minthostachys mollis*, procedente del distrito de Marangani, provincia de Canchis departamento de Cusco, Se cortaron los tallos con tijeras de podar, la recolección se hizo aproximadamente a las 6:00 de la mañana, obteniéndose aproximadamente 10 kilos de la especie en estudio.

La especie recolectada fue llevada al laboratorio de Ingeniera Química de la Universidad Nacional del Altiplano, para el secado de la planta en un ambiente cerrado,

protegido de la luz solar por 5 días. Después se seleccionó las hojas de la planta para extraer el aceite.

3.5.2 Segunda Etapa

Obtención del Aceite Esencial del *Minthostachys mollis* (Muña)

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

El método consiste en que los aceites esenciales son arrastrados por la corriente de vapor de agua que se genera en la fuente de vapor, luego esta mezcla (vapor de agua y aceite) es condensada mediante su paso por un refrigerante de vidrio para luego separar el aceite del agua por simple diferencia de densidad.

Se procedió a colocar en el equipo de hidrodestilación las hojas del vegetal, pesado previamente; colocando 4 kilogramos de hoja de muña en el compartimiento para la extracción, luego se procedió a cerrar y asegurar el equipo. Luego se encendió la fuente de calor (mechero de gas), se procedió a esperar a que la temperatura llegue a los 50 °C, para abrir llave del refrigerante. Al momento de expulsión de las primeras gotas hacia el balón de recogida de aceite esencial se procedió a tomar el tiempo, culminado el tiempo de colección a las 2 horas, obteniéndose 27 ml de 4 kg de hojas de muña.

El aceite obtenido fue colocado en un frasco ámbar estéril con tapa y conservado a una temperatura -20 °C.

Una muestra de aceite fue sometida a un estudio organoléptico y físico y químico para determinar sus características.

El aceite esencial obtenido tubo las siguientes características organolépticas y fisicoquímicas (Anexo 03)

Color : Incoloro

Olor : Característico del producto

Aspecto : Liquido viscoso

Sabor : Picante amargo

Densidad : 0,895 g/cm³

PH : 2.8

3.5.3 Tercera Etapa

3.5.4 Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

3.5.4.1 Cepas bacterianas para el estudio

Por tratarse de un estudio experimental, se trabajó con microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos. Las cuales fueron adquiridas del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana-UNA

Las cepas tipificadas fueron previamente identificadas:

Por el desarrollo de las colonias, observación macroscópica por los aspectos culturales de la colonia y su morfología estructural.

Por la tinción de gram, para la observación microscópica para observar la morfología bacteriana y la identificación de gram positivos y gram negativos.

Identificación biológica: Se realizaron pruebas específicas bioquímicas para conocer el productos finales de su metabolismo, se hizo pruebas de la catalasa, esculina, inulina, manitol, manitol, carbohidratos, benzoil, arginina.

Prueba inmunológica se enfrentó el anticuerpo de la bacteria con el antígeno del medio para formar un complejo antígeno anticuerpo para observar la reacción hemolítica.

Resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos, vancomicina, penicilinas, amikacina, rifampicina, cefalosporina, macrolidos, lincosamidas, cloranfenicol y aminoglicosidos.

3.5.4.2 Reconstitución de cepas bacterianas.

Se procedió según lo propuesto por el Instituto Nacional de Salud en su manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarios. Lima (2005)

Streptococcus mutans: Sembrados en el agar selectivo Mitis- Salivarius, adicionando bacitracina, incubados en jarra de anaerobios.

Porphyromonas gingivalis: Sembrados en agar Columbia, suplementado con sangre al 5%, hemina, vitamina k y bacitracina incubados en jarra anaerobiosis.

3.5.4.3 Viabilizacion de las cepas.

Streptococcus mutans: Para viabilizar la cepa bacteriana se utilizó un tubo con caldo thioglicolato, donde se inoculo las cepas de *Streptococcus mutans*, en condiciones estériles, se llevó a incubadora 37°C para activar el crecimiento por un lapso de 18 horas.

Al cabo de 18 horas se realizó el replicado del inculo hasta su desarrollo y crecimiento. Luego el *Streptococcus mutans*, se le replica en 5 placa conteniendo agar selectivo Mitis- Salivarius, por el método de sembrado por agotamiento, se adiciono bacitracina, para luego cultivarlo e incubarlo en jarra de anaerobios a una temperatura de 37°C por 24 horas, pasado las 24 horas se incuba en condiciones de aerobios por otras 24 horas a una temperatura de 37°C.

Obtenidos el crecimiento y desarrollo del germen se procedió hacer el análisis macroscópico de las colonias, la coloración de gram para ver los aspectos estructurales y morfológicos, se procedió a identificar los aspectos biológicos.

Porphyromonas gingivalis: Para viabilizar esta cepa bacteriana se utilizó un tubo con caldo thioglicolato, donde se inoculo las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, en condiciones estériles, se llevó a incubadora 37°C por un lapso de 18 horas.

Al cabo de 18 horas se realizó el replicado con este inculo hasta su desarrollo y crecimiento. *Porphyromonas gingivalis*, se replicó en 5 placa conteniendo agar Columbia, con sangre al 5%, hemina, vitamina k y bacitracina, para luego cultivarlo en jarra de anaerobiosis de CO₂ (se coloca en el interior de la jarra una pequeña vela encendida que al ser cerrada combustiona el O₂ y libera el C O₂) a 37°C por 8 días.

Obtenidos el crecimiento y desarrollo del germen se procedió hacer el análisis macroscópico de las colonias, utilizando los aspectos culturales, para luego hacer la coloración de gram para ver los aspectos estructurales y morfológicos de la colonia y las características del comportamiento biológico.

Preparación del estándar Mc Farland

Se preparó el estándar correspondiente a la escalas 0.5 en un tubo de ensayo estéril, se midió de cloruro de bario y se añadió 99.5 ml de ácido sulfúrico 0.36 N, se tapó el tubo con una tapa rosca y se procedió a mezclar cuidadosamente.

Verificar la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro o espectrofotómetro, cuya absorbancia a 540 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.

Preparación del inóculo

Se obtuvo crecimiento en placa, la totalidad de las colonias se utilizó para la preparación del inóculo.

Para la dilución se trabajó con el asa de kolle, la totalidad de las colonias de las cepas bacterianas desarrolladas en el medio de cultivo, luego se transfirieron a un tubo 1 que contiene 10 ml de caldo Mueller Hinton se homogenizaron, se transfirió a un segundo tubo 1 ml., del tubo 1, así sucesivamente hasta encontrar la turbidez estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland. Con esta escala se consigue 10^8 ufc.

3.5.4.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

a) Preparación de las diluciones del aceite esencial

Se preparó el tratamiento con diluciones en concentraciones de 0.056g/ml, 0.112g/ml, 0.0224g/ml, 0.336g/ml, 0.448g/ml, del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña), se preparó 50 ml de Caldo Mueller Hinton. Para ser distribuidos en tubos de capacidad de 7 x 7cm. A cada tubo se agregó 1 ml de Caldo Mueller Hinton, se adiciona 1ml de inóculos bacteriano de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

b) Determinación de la CMI para *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*.

- ***Streptococcus mutans.***

El experimento se realizó en 5 tubos de los cuales se hicieron 4 repeticiones en tubo de 7 x 7cm agregando 1 ml, de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) en concentraciones de 0.056g/ml, 0.112g/ml, 0.0224g/ml, 0.336g/ml, 0.448g/ml respectivamente, haciendo un total de 20 tubos, a los que se agregó 1 ml. de inóculo por tubo y 1 ml de caldo Mueller Hinton, Se lleva a incubar por espacio de 18 horas a 37°C.

Luego se efectuó la lectura de cada tubo en el espectrofotómetro, a una absorbancia (densidad óptica); de 540 nm, de longitud de onda.

- ***Porphyromonas gingivalis.***

El experimento se realizó en 5 tubos de los cuales se hicieron 4 repeticiones en tubos de 7 x 7cm agregando 1 ml. de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) en concentraciones de 0.056g/ml, 0.112g/ml, 0.0224g/ml, 0.336g/ml,0.448g/ml respectivamente, haciendo un total de 20 tubos, a los que se agregó 1 ml. de inóculo por tubo y 1 ml de caldo Mueller Hinton, Se lleva a incubar por espacio de 18 horas a 37°C.

Luego se efectuó la lectura de cada tubo en el espectrofotómetro, a una absorbancia (densidad óptica); de 540 nm, de longitud de onda.

3.6 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se cuenta con las constancias y certificados de los resultados de laboratorio.

- Por el uso del laboratorio de taxonomía vegetal de la facultad de ciencias agrarias de la UNA-Puno (Anexo 04)
- Por el uso del Laboratorio de procesos y operaciones unitarios de la Facultad de Ingeniería Química UNA-Puno (Anexo 05)
- Por el uso de Laboratorio de análisis de agua de la Facultad de Ingeniería Química UNA-Puno

3.7 VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

Se realizó una prueba piloto, para verificar si el instrumento valida la metodología, donde tuvimos algunos cambios, que fueron reportados.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se han utilizado los métodos de análisis estadístico.

Los análisis se realizaron con el software SPSSV19 (statistical package for social sciences). Se empleó análisis descriptivo para obtener los promedios y desviaciones estándar de las variables.

Se aplicó la prueba T- students para obtener la diferencia estadística del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* a diferentes concentraciones, se utilizó la prueba de ANOVA para obtener la diferencia estadística del efecto de inhibición del aceite esencial frente a la actividad bacteria a las concentraciones de aceite esencial *Minthostachys mollis*.

3.9 RECURSOS

3.9.1 HUMANOS

Directora de la tesis : Dra. Sonia C. Macedo Valdivia

Asesor de la tesis : CD. Roció E. Apaza Cuno

Asesor estadístico : Paola V. Acurio

Investigador : Sofia N. Ccallo Laucata

Laboratorista : Blgo. Balbino Lorgio Palacios Frisancho

3.9.2 MATERIALES

A. Material para la recolección del vegetal

- Bolsas de papel.

- Tijera podadora.

B. Material para la extracción del aceite esencial de la planta.

- Destilador por arrastre a vapor.
- Mechero de gas.
- Balanza.
- Soporte universal.
- Balón de vidrio.
- Aro de soporte.

- Pinza de soporte.

- Mangueras.

C. Colección de aceite esencial.

- Balón de vidrio
- Pipeta Pasteur
- Frasco ámbar
- Agua destilada
- Escobilla

D. Equipos y materiales de laboratorio utilizado en el experimento

a) Equipo de laboratorio

- Estufa de esterilización
- Estufa de incubación J.P.SELECTA

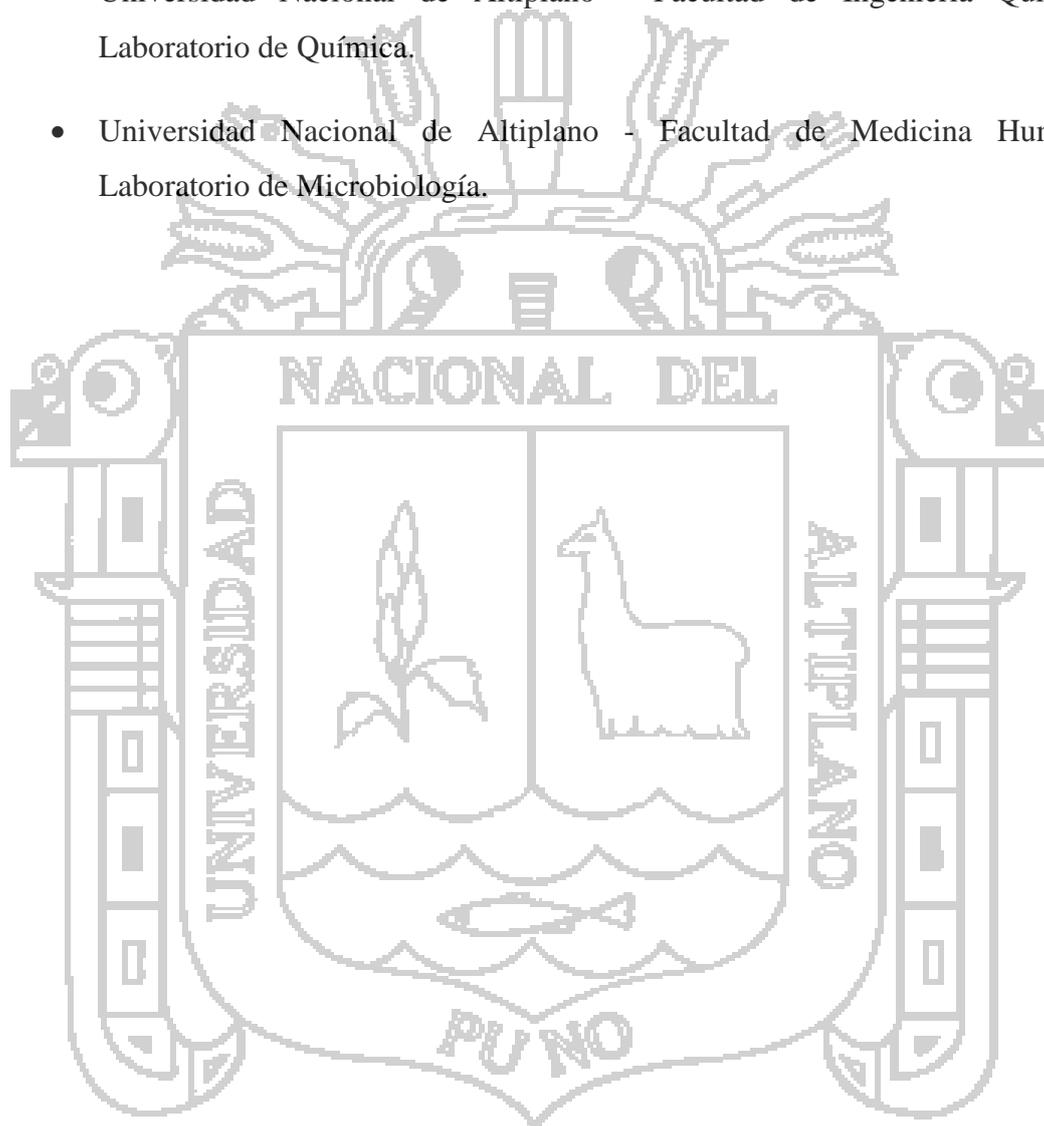
- Autoclave vertical digital AV- 10059
- Microscopio ZEISS primo Star
- Balanza analítica Sartorius
- Balanza analítica HS-200
- Cocina eléctrica MGF:8022
- Refrigeradora

b) Materiales del laboratorio

- Tubos de ensayo 2 y 5 ml
- Vasos de precipitado de 150 y 200 ml
- Placas Petri pyrex
- Asa de siembra
- Pipetas de 1.5 y 10 ml
- Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 5000 ml
- Probetas de 25, 50 ml
- Gradillas
- Lamina portaobjeto
- Mechero Bunsen
- Azas de kolle
- Jarra de anaerobiosis

3.9.3 Institucionales

- Universidad Nacional de Altiplano - Escuela Profesional de Ingeniería Agronómica- Laboratorio de taxonomía vegetal.
- Universidad Nacional de Altiplano - Facultad de Ingeniería Química - Laboratorio de procesos y operaciones unitarias.
- Universidad Nacional de Altiplano - Facultad de Ingeniería Química - Laboratorio de Química.
- Universidad Nacional de Altiplano - Facultad de Medicina Humana - Laboratorio de Microbiología.





4.1 ÁMBITO DE ESTUDIO

La investigación se desarrolló en el Distrito de Puno, Provincia de Puno, Departamento de Puno.

Puno es un departamento del Perú situado en el sureste del país. Ocupa 67 mil km² de territorio conformado por la mitad occidental de la Meseta del Collao, al oeste del lago Titicaca, y las yungas amazónicas al norte. Limita al este con territorio boliviano, al suroeste con los departamentos de Tacna, Moquegua y Arequipa, al oeste con el del Cuzco y al norte con Madre de Dios. La capital del departamento es la ciudad de Puno, a orillas del mítico Lago Titicaca, el lago navegable más alto del mundo, a 3.827 m.s.n.m.

La investigación se desarrolló en los ambientes y laboratorios de la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional del Altiplano ubicada en la Av. florar N^o 1135. Los laboratorios utilizados fueron:

- Laboratorio de taxonomía vegetal la Facultad de ciencias agrarias. De la Universidad Nacional de Altiplano, donde se hizo el estudio de la especie de la planta.
- Laboratorio de procesos y operaciones unitarias de la Facultad de Ingeniería Química. De la Universidad Nacional de Altiplano, donde se obtuvo el aceite esencial de la muña.
- Laboratorio de microbiología de la Facultad de medicina humana. De la Universidad Nacional de Altiplano, donde se realizó el procedimiento, el análisis y la lectura de los resultados.
- Laboratorio de control de calidad de la facultad de ingeniería química: De la Universidad Nacional de Altiplano, donde se hizo el estudio físico-químico del aceite esencial.

El estudio fue realizado con *Minthostachys mollis* procedente de la localidad de Marangani, provincia de Canchis, situado en el departamento de cusco, a 152.00 km al sur este de la capital departamental, Marangani está ubicado en 3 698 msnm., posee

clima templado y producen toda clase de productos. Limita por el norte con el distrito de Sicuani, por el sur con el distrito de Canas, por el este con el departamento de Puno y por el oeste con el distrito de Canas.





TABLA N° 1

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Minthostachys mollis (Muña) FRENTE A LA ACTIVIDAD BACTERIANA DE
Streptococcus mutans PUNO-2013

| Concentración de aceite esencial | N° de Repeticiones | Media UFC/ml | Media % inhibición | DS |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|--------|
| 0.056g/ml | 4 | 9.78X10 ⁵ | 2.2 % | 0.0107 |
| 0.112g/ml | 4 | 8.32X10 ⁵ | 16.8 % | 0.0059 |
| 0.0224g/ml | 4 | 7.6375X10 ⁵ | 23.63% | 0.0102 |
| 0.336g/ml | 4 | 6.455X10 ⁵ | 35.45% | 0.0087 |
| 0.448g/ml) | 4 | 4.995x10 ⁵ | 50.05 % | 0.035 |

Fuente : Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología UNA-Puno.

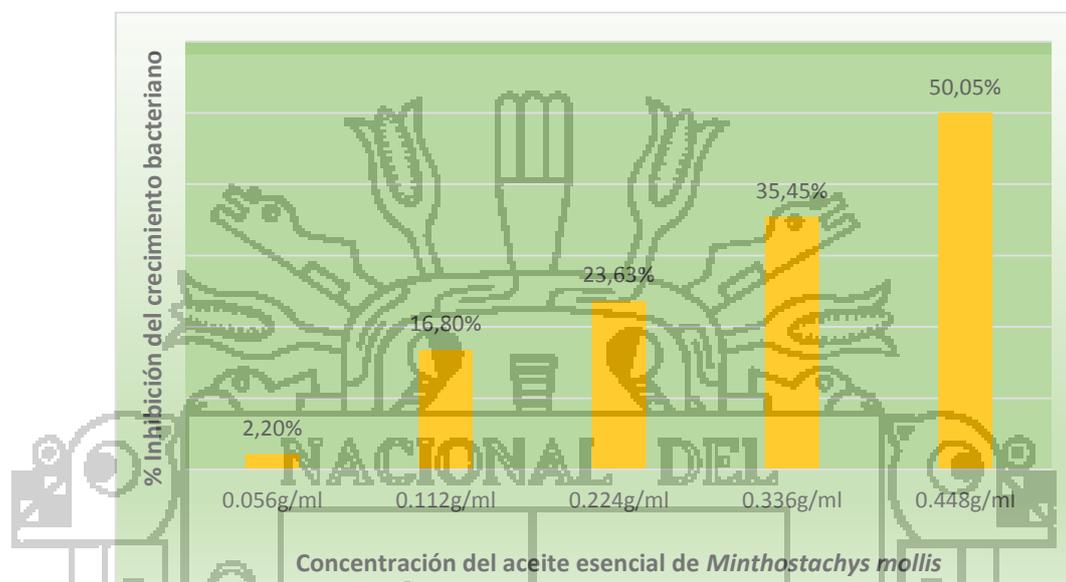
Elaboración : Por el autor de investigación.

Interpretación:

La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* es 0.448gr/ml de aceite esencial, ya que es la única concentración que inhibe el 50% del crecimiento bacteriano.

Aplicando la prueba ANOVA, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa P<0.01 ANOVA del efecto de inhibición del aceite esencial frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans*. Del aceite esencial a diferentes concentraciones, lo que quiere decir que el efecto inhibitorio va depender de la concentración de aceite esencial que se aplica en cada prueba.

FIGURA N° 1



COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE *Streptococcus mutans* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*. PUNO-2013

Fuente : Representación de figura de la tabla N° 1.
Elaboración : Por el autor de investigación.

TABLA N° 2

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Minthostachys mollis (Muña) FRENTE A LA ACTIVIDAD BACTERIANA DE
Porphyromonas gingivalis. PUNO-2013

| Concentración de aceite esencial | N° de Repeticiones | UFC/ml | % inhibición | DS |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|--------------|--------|
| 0.056g/ml | 4 | 1.0845X10 ⁵ | 0% | 0 |
| 0.112g/ml | 4 | 9.79X10 ⁵ | 2.1% | 0.0058 |
| 0.0224g/ml | 4 | 9.41X10 ⁵ | 5.9 % | 0.0089 |
| 0.336g/ml | 4 | 8.31X10 ⁵ | 16.9% | 0.0053 |
| 0.448g/ml | 4 | 7.695X10 ⁵ | 23.05% | 0.0092 |

Fuente : Datos obtenidos en el Laboratorio de Microbiología UNA-Puno.

Elaboración : Por el autor de investigación.

Interpretación:

La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* es mayor a 0.448g/ml de aceite esencial, ya que en la mayor concentración trabajada solo se inhibió el 23.05 % de crecimiento bacteriano.

Aplicando la prueba ANOVA se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa $P < 0.01$ ANOVA del efecto de inhibición frente a la actividad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis*, del aceite esencial a diferentes concentración, lo que quiere decir que el efecto inhibitorio va a depender de la concentración de aceite esencial que se aplica en cada prueba.

FIGURA N° 2



COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE *Porphyromonas gingivalis* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*. PUNO 2013.

Fuente : Representación de figura de la tabla N° 2.

Elaboración : Por el autor de investigación.

TABLA N° 3

CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Minthostachys mollis (Muña) FRENTE A LA ACTIVIDAD BACTERIANA DE
Streptococcus mutans y *Porphyromonas gingivalis*. PUNO-2013

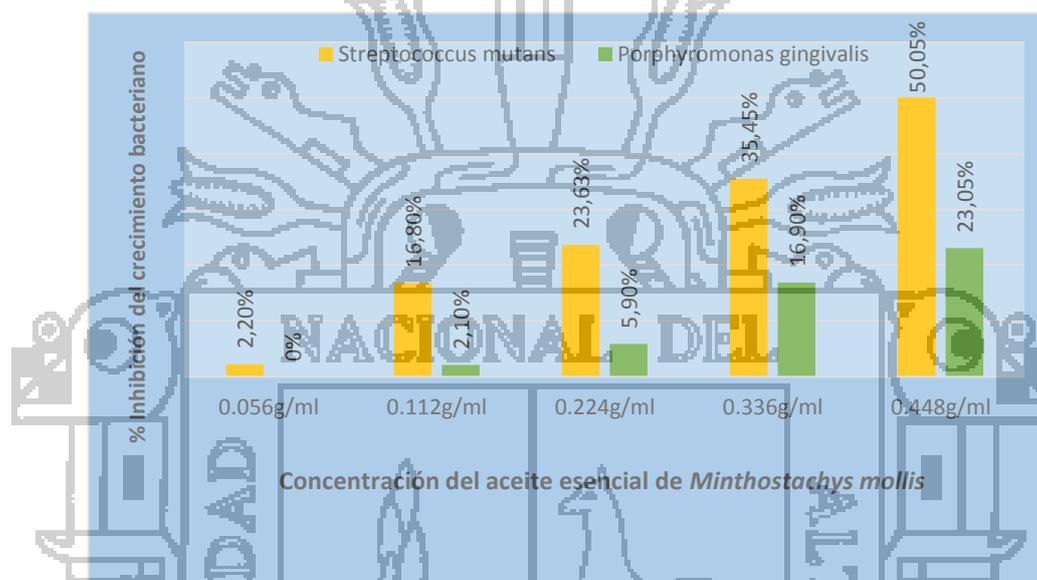
| Especie | Concentración de aceite esencial | | | | | CMI |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| | 0.056g/ml | 0.112g/ml | 0.224g/ml | 0.336g/ml | 0.448g/ml | |
| <i>Streptococcus mutans</i> | 2.20% | 16.80% | 23.63% | 35.45% | 50.05% | 0.448g/ml |
| <i>Porphyromonas gingivalis</i> | 0% | 2.10% | 5.90% | 16.90% | 23.05% | >0.448g/ml |

Fuente : Datos obtenidos de la tabla N°1 y Tabla N° 2.
Elaboración : Por el autor de investigación.

Interpretación:

La prueba de "T" de Student indica la existencia de diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) del efecto de inhibición de la actividad bacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) entre ambos microorganismos según el porcentaje de inhibición, hay diferencia en las cinco concentraciones. Para aplicar la prueba T se requiere de un promedio y varianza, para la primera comparación, la varianza es cero, por lo tanto se asume que si existe diferencia.

FIGURA N° 3



COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO DE *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*. PUNO-2013.

Fuente : Representación de figura de la tabla N° 3.

Elaboración : Por el autor de investigación.

5.1 DISCUSIONES

En la presente investigación para determinar la CMI de *Minthostachys mollis* se obtuvo su aceite esencial producto de la destilación de las hojas de la planta al igual que (Carhuapoma M, López S, Andamayo D, Bell C 2009). Y a diferencia de las investigaciones realizadas por Azaña Espinoza (2010) y Molina Chicata (2008) que obtuvieron el aceite esencial de la destilación de hojas, tallos y flores.

La especie *Minthostachys mollis* con la que se trabajó en la presente investigación proviene del distrito de Marangani distrito del departamento de Cusco mientras que Molina Chicata no menciona el origen de la especie que estudio, Azaña Espinoza recolecto la planta en las alturas del centro poblado menor de Muruhuay (Tarma), Figueroa, trabajo con una especie oriunda de Bolivia y Carhuapoma M, López S, Andamayo D, Bell C. colectaron la planta en el distrito de Huamanguilla (3000-3200 msnm), provincia de Huanta, región Ayacucho,

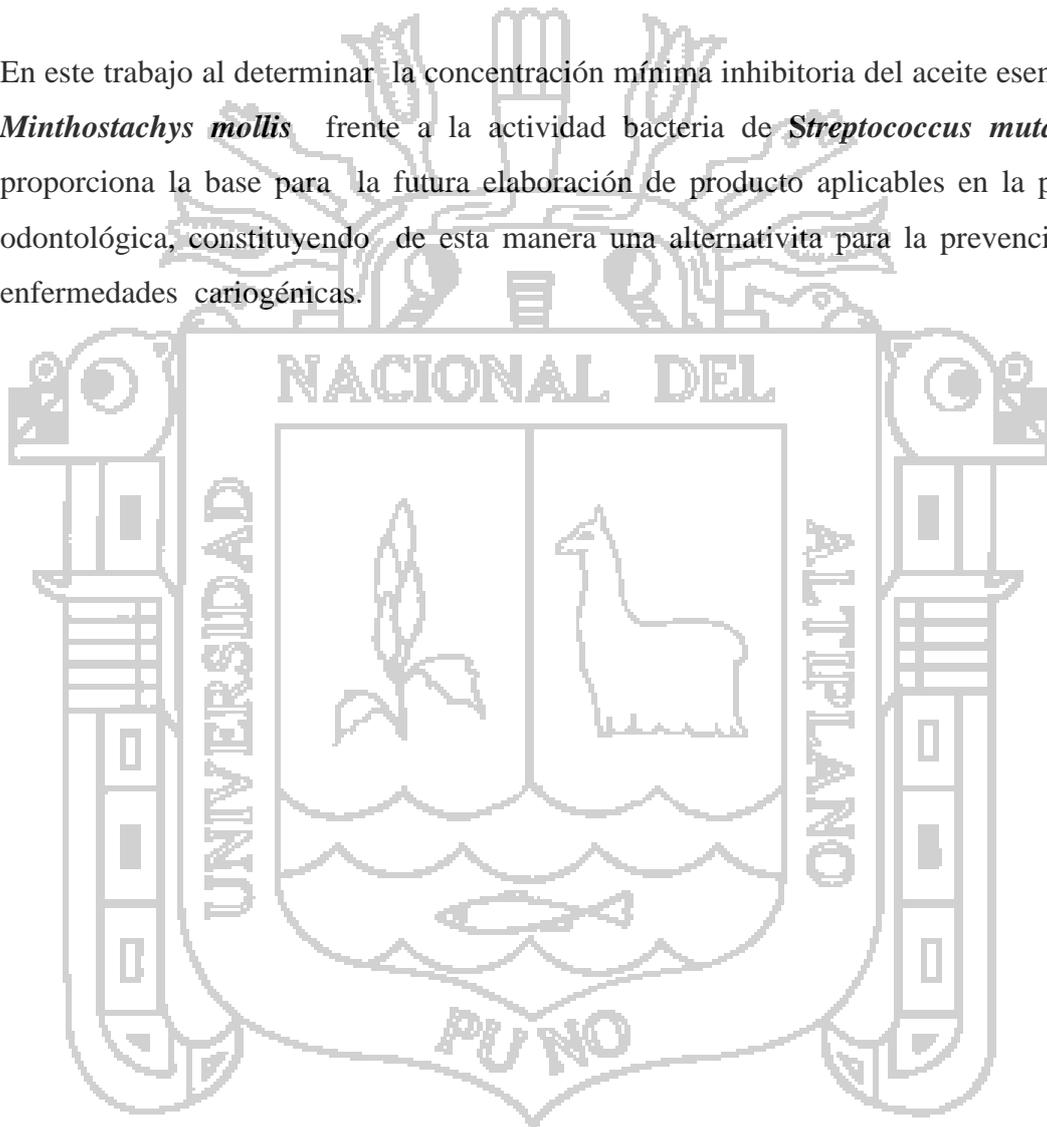
En la siguiente investigación se determinó La CMI mediante el método de macrodilución que es un método bien establecido para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos. El agente antimicrobiano se incorpora a diversas concentraciones dentro de tubos de hemolisis para después de incubar y ver a que concentración se inhibió el crecimiento de microorganismos, a diferencia de otros estudios como el de Figueroa, Azaña Espinoza, (Carhuapoma M, López S, Andamayo D, Bell C (2009), Molina Chicata (2008), Medina Santillana G que utilizaron otros métodos

En nuestro estudio se determinó que la CMI del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a *Porphyromonas gingivalis* es mayor a 0.448g/ml mientras que la CMI del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. "Tomillo" para el *Porphyromonas gingivalis* es 0,31 mg/ml y CMB es 0,37 mg/ml que determinaron mediante el método de difusión en disco (Kirby Bauer).

En el estudio realizado por Molina se determinó que el *Minthostachys mollis* grises posee efecto antibacteriano frente a las bacterias de la placa supragingival a las 24 y 48 horas. El siguiente trabajo se realizó con cepas específicas y se determinó la CMI para *Streptococcus mutans* que es de 0.448g/ml, lo que representa una mejora significativa en el estudio del efecto antibacteriano de la muña.

En el estudio realizado por Medina Santillana el Efecto antibacteriano IN VITRO de *Erythroxylum coca*, llipta frente al *Streptococcus mutans* CMI (5g/100mg) que representa un promedio de 18.33 colonias de *S.mutans* En este trabajo la CMI del aceite esencial de la muña frente al *S.mutans* es 0.448gr/ml que representa el 50.05% de colonias, de esta manera se puede afirmar que el *Streptococcus mutans* es inhibido por los elementos activos de la coca, llipta y muña.

En este trabajo al determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteria de *Streptococcus mutans*, se proporciona la base para la futura elaboración de producto aplicables en la práctica odontológica, constituyendo de esta manera una alternativa para la prevención de enfermedades cariogénicas.



5.2 CONCLUSIONES

La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (Muña) frente a la actividad bacteriana del *Streptococcus mutans* es 0.448g/ml y para el *Porphyromonas gingivalis* es >0.448g/ml.

- La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana del *Streptococcus mutans* es en la concentración de 0.448g/ml.
- La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* es mayor a 0.448g/ml.
- La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana del *Streptococcus mutans* es menor en comparación a la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* frente a la actividad bacteriana del *Porphyromonas gingivalis*, este resultado fue comprobado con la prueba T Student $p < 0.05$, que nos indica diferencia estadística significativa.

5.3 RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos posteriores con mayores contracciones de 0.448g/ml, de aceite esencial de *Minthostachys mollis* para determinar concentración mínima inhibitoria frente *Porphyromonas gingivalis* y otras especies bacteriana de importancia estomatológica.
- Hacer investigación para determinar la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) como elemento activo de colutorios, pastas dentales y otros.
- Realizar trabajos de investigación donde se y utilice un solo método para estandarizar, así poder determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceite esencial y así poder comparar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de las diferentes planta que hasta el momento han demostrado tener efecto antibacteriano frente a bacteria de importancia estomatológica.
- Determinar la concentración de los principios activos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) procedente de área geografía de cusco, porque no se encuentran investigaciones que hayan determinado el porcentaje de los componentes químicos del aceite esencial de la muña proveniente del Cusco.
- Implementar laboratorio de microbiología en la Escuela Profesional de Odontología para mejor entrenamiento de los alumnos en el área y hacer investigaciones.

BIBLIOGRAFIA Y FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Pastor G. Estudio Morfohistológico y Microhistoquímico de *Desmodium vargassanum* Sch (Tesis de pregrado). Trujillo, Perú: Universidad Nacional del Centro Facultad de Farmacia y Bioquímica; 1991.
2. Ferjerskov O, Kidd E. *Dental Caries*. 2 ed. Singapore: Blackwell Munksgaard Ltda; 2010
3. Cuenca E, Baca P. *Odontología preventiva y comunitaria*. 3ed. Barcelona, España: Masson, SA; 2005
4. Varela M, *problemas bucodentales en pediatría*, 1ed. Madrid, España Ergon. S.A. 1999
5. Figueroa, N. *evaluación antibacteriana, antifúngica, insecticida y caracterización de los aceites esenciales extridos de especies vegetales aromáticas con valor comercial*. Universidad Nacional de San Andrés. La Paz Bolivia 1996
6. Alfredo Mauricio Bastida de Paula, Rafael Tomaz Gomes, Warner Kwasnicka Santiago, Ricardo Souza Dias, Maria Espinoza Cotes, Vagner Rorigues Santos, *Susceptibility of oral pathogenic bacteria and fungi to Brazilian Green propolis extract*. Laboratorio of Microbiology and Biomateriales, Dentistry School, Universidade Federal de Minas Gerais; Food Microbiology Laboratory- Fundacao Ezequiel Dias (FUNED) – Belo Horizonte, Brazil. *Pharmacology online* 3:467-473(2006)
7. Carhuapoma M, Lopez S, Andamayo D, Bell C. *Aceites Esenciales de Muña *minthostachys mollis* y su efecto antimicrobiano frente a cuatro cepas de bacterias gran negativa* (Tesis de licenciatura en Odontología). Lima: Universidad Nacional de San Marcos. 2009
8. Lagos La Rosa E. *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *thymus vulgaris* l. tomillo frente a *porphyromonas gingivalis* atcc 33277 causante de gingivitis*. (Tesis Para optar el título de químico farmacéutico) Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann - Tacna. 2012
9. Azaña I. *Efectividad Antibacteriana in vitro del aceite esencial de *minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas*

- de origen endodóntico (Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista). Lima Universidad Nacional de San Marcos. 2010
10. Molina M, estudio in vitro el efecto antibacteriano de *Minthostachys mollis grises* (*Muña*), comparando con la amoxicilina frente a bacterias de placa supragingival; (Tesis para optar título profesional de Cirujano Dentista). Puno Universidad Nacional del Altiplano.2008
 11. Medina G. Efecto antibacteriano IN VITRO de *Erythroxylum coca*, *llipta* y la combinación de ambos en cultivos de *Streotoccus mutans* y *aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista). Puno Universidad Nacional del Altiplano. 2012
 12. Negroni M. Microbiología Estomatológica. 2da ed. Buenos Aire, Argentina Editorial Medica Panamericana, 2009
 13. Libiana J. Microbiología oral.2° ed. Madrid, España: Mc graw Hill; 2002.
 14. Joklik A. Zinnsser Microbiología. 20° edición, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1994: 841-848, 855-856.
 15. Gutiérrez S. fundamentos de ciencias básicas aplicados a la odontología 1ed.Editorial Pontificio Universidad. Bogotá, Colombia; 2006
 16. Olsen I, Shhah HN & Gharbia SE. Taxonomy and Biochemical Characteristics of *Actinobacillus Atinomycemcomitans* and *Porphyromonagingivalis*. Periodontol 2000
 17. Ignacio del Rio Martinez P.Actividad Biocida de un propolis chileno frente a *porphyromonas gingivalis*: estudio in vitro. (Tesis para optar al título de cirujano dentista). Facultad de Odontología, Universidad de Chile.2004
 18. Olsen I, Shhah HN & Gharbia SE. Taxonomy and biochemical characteristics of *Actinobacillus actinomycemcomitans* and *Porphyromona gingivalis*. Periodontol. 2000
 19. Lamont R, & Jenkinson H. Life below the gum line: Pathogenic Mechanism of *Porphyromona gingivalis*. Microbiol Mol Biol Rev.1999
 20. Holt S, Kesavalu L, Walker S. & Genco C. (1999). Virulence factors of *Porphyromona gingivalis*. Periodontol 2000
 21. Shah HN, Hardie JM. Taxonomic studies on *Bacteroides Melaninogenicus*, *Bacteroides Oralis*, *Bacteroides Ruminicola* and related Organisms.Res Clin Forums.1979

22. Bardales A, Yarlequé M, Rueda L. Estudio biológico y Fitoquímica del extracto alcohólico de *Minthostachys mollis* "Muña". I Congreso Internacional de Biología - XIII Congreso Nacional de Biología- VII Simposium de Educación en Ciencias Biológicas. Lima: Perú; 1999.
23. Morales A. Estudio de la extracción y características de los aceites esenciales de *M. Mollis* y de *S. Sagittata* (hierba buena). (Tesis de bachiller para Químico). Lima: UNALM; 1973
24. Agapito T. y Sung I. Fito Medicina 110 Plantas Medicinales. 1° edición. Lima: Editorial Isabel IRL; 2003.
25. Gibaja S. Investigaciones químicas de la muña *M. mollis*. (Tesis de bachiller para el título de Químico). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1960.
26. Cano C. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). (Tesis de maestría para Magister en Recursos Vegetales y Terapéuticos). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2007.
27. Azaña I. Efectividad Antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. (Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010.
28. Phalow, M. El gran libro de las plantas. Segunda edición. Editorial Everest, S.A. México. 1979
29. Tyler y COL, Farmacognosia. 2da Edición. Editorial el Ateneo. Argentina. 1979.
30. Podlech, D. Gran guía de la naturaleza-plantas medicinales Editorial everest S.A. 1992
31. Gennaro A. Remington Farmacia. 20ava Edición. Argentina. Editorial medica panamericana .2003
32. Augusto W. Fraccionamiento del aceite esencial de *M. Mollis* (muña) y su aplicación en la inhibición del brotamiento de papa cultivar mariva. (Tesis de bachiller para Químico). Lima: UNALM; 1975
33. Zekaria, Dan. Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorios Calier. 2006
34. Brunenton, J. Elementos de Fotoquímica y Farmacognosia. Editorial Acriba. España. 1991
35. Martínez, M. Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Medellín. 2003

36. Fuselli s., R. Y COL. Inhibición de Paenibacillus larvae empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina. 2006
37. Van Ginkel, A. Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.” 2003





ANEXO 1



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO-PUNO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA



CERTIFICACION DE CEPAS BACTERIANAS.

Certifica que la pureza del *streptococos mutans*, se ha obtenido tomando en cuenta el siguiente procedimiento:

1.- Para la identificación del *streptococos mutans*, se tomo en cuenta el criterio genotípico:

SEROTIPOS: C, E Y F

2.- Para la identificación del *streptococos mutans*, se tomo en cuenta el criterio fenotípicos:

- a).- Morfología microscópica y características tintoriales: Cocos gram positivos, se asocian en parejas y cadenas cortas o largas.
- b).- Morfología macroscopica (colonias): colonias discoidales, grises, opalescentes, delicadas, de bordes lisos, mucoides y superficie granular.
- c).- Requerimientos ambientales para el crecimiento: Anaerobios Facultativos, aumenta su crecimiento en presencia de CO₂ al 5% y a 37 °C.
- d).- Resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos: sensibles a las penicilinas, cefalosporinas, macrolidos, aminoglicosidos, vancomicina, rifampicina, clotrimoxazol, lincosamidas y cloranfenicol.
- e).- Propiedades bioquímicas: Esculina, inulina, manitol, rafinosa y sorbitol positivos. No producen catalasa y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico.

Nota.- Para la obtención de esta cepa pura se siguió los métodos estándares propuesto por el Instituto Nacional de Salud.


 BALBINO LORGIO PALACIOS FRISANCHO
 C.B.P. N° 2125
 BIOLOGO



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO-PUNO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA



CERTIFICACION DE CEPAS BACTERIANAS.

Certifica que la pureza del *porphyromonas gingivalis*, se ha obtenido tomando en cuenta el siguiente procedimiento:

1.- Para la identificación del *porphyromonas gingivalis*, se tomo en cuenta el criterio genotípico:

Serotipo: b

2.- Para la identificación del *porphyromonas gingivalis*, se tomo en cuenta el criterio fenotipicos:

a).- Morfología microscópica y características tintoriales: en la coloración de gram se evidencia una morfología coco bacilos gram negativo.

b).- Morfología macroscopica (colonias): presentan una pigmentación marron a negro, grises, forma redonda convexa, delicadas, de bordes lisos.

c).- Requerimientos ambientales para el crecimiento: Anaerobios estrictos, con un crecimiento a partir de los 7 días, aumenta su crecimiento en presencia de CO₂ al 5% y a 37 °C.

d).- Resistencia o sensibilidad a los antimicrobianos: Resistente a las penicilinas, amikacina.

e).- Propiedades bioquímicas: A LA PRUEBA BENZOIL-DL-ARGININA-NAFTILAMIDA POSITIVO

Nota.- Para la obtención de esta cepa pura se siguió los métodos estándares propuesto por el Instituto Nacional de Salud.


BALBINO LORGIO PALACIOS FRISANCHO
C.B.P. N° 2125
BIOLOGO

ANEXO 2

**CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Minthostachys mollis (MUÑA) FRENTE A LA ACTIVIDAD
BACTERIANA DE *streptococcus mutans* y *porphyromonas gingivalis*.
PUNO-2013**

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

PRUEBA N° :

BACTERIAS :

FECHA :

| Dilución del aceite esencial en g/ml | Turbidez |
|--------------------------------------|----------|
| | UFC |
| 0.056g/ml | |
| 0.112g/ml | |
| 0.224g/ml | |
| 0.336g/ml | |
| 0.448g/ml | |
| | |



ANEXO 3



Universidad Nacional del Altiplano - Puno

FACULTAD DE INGENIERÍA
LABORATORIO DE QUIMICA

03685



Certificado de Análisis

IQ-2013

ASUNTO : Análisis Físico Químico de ACEITE ESENCIAL de: MUÑA
 PROCEDENCIA : Departamento de Puno (materia prima)
 INTERESADO : Bach. Sofia Nancy Ccallo Laucata
 MOTIVO : Proyecto de Investigación titulado: "CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Minthostachys mollis* (muña) FRENTE A LA ACTIVIDAD BACTERIANA DE *Streptococcus mutans* Y *porphyromonas gingivalis*."
 MUESTREO : 26/08/2013, por el interesado
 ANÁLISIS : 26/08/2013

CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS:

ASPECTO : Líquido viscoso
 COLOR : Incoloro
 OLOR : Característico del producto
 SABOR : Picante amargo

CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUIMICAS

pH : 2,8
 Densidad : 0,895 g/cm³
 Índice de refracción : 1,41
 Solubilidad en agua : Insoluble
 Solubilidad en acetona : Soluble
 Solubilidad en alcohol : Soluble

Puno, C.U. 27 de agosto del 2013.
 VºBº



Walter B. Aparicio Aragon Ph. D.
 DECANO
 FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA
 UNA - PUNO



Ang BERMAN QUINLE CALIZAYA
 Jefe Laboratorio Control de Calidad
 FACULTAD INGENIERIA QUIMICA
 UNA - PUNO

ANEXO 4



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA
LABORATORIO DE TAXONOMÍA VEGETAL



CONSTANCIA

EI QUE SUBSCRIBE JEFE DEL LABORATORIO DE TAXONOMÍA VEGETAL DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS DE LA U. N. A. PUNO, HACE CONSTAR QUE EL ESPECÍMEN BOTÁNICO PUESTO A LA VISTA PERTENECE A LA ESPECIE *Minthostachys mollis* "muña" que posee la siguiente Posición Taxonómica.

REINO Vegetal
SUB REINO Phanerogamae
DIVISIÓN Angiospermae
CLASE Dicotyledoneae
SUB CLASE Methachlamydeae
ÓRDEN Solanales
FAMILIA Menthaceae
GÉNERO *Minthostachys*
ESPECIE *Minthostachys mollis*

SE EXPIDE LA PRESENTE CONSTANCIA A PETICIÓN ESCRITA DE LA SEÑORITA SOFIA NANCY CCALLO LAUCATA ESTUDIANTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE SALUD UNA PUNO. PARA LOS FINES QUE VIERE POR CONVENIENTE.

PUNO, C.U. 06 de agosto del 2013



ING. MARIO A. SOLANO LARICO
Jefe Laboratorio Taxonomía Vegetal
FCA UNA - PUNO



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FAC. CS. AGRARIAS
PUNO
Ing. Julio Meyta Quispe, M.Sc.
DECANO

ANEXO 5



Universidad Nacional del Altiplano - Puno

FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA

Ciudad Universitaria - Apartado 291 - Telefax: (051) 366190 - Fax (051) 366190



N° 032-13

CONSTANCIA

EL DECANO DE LA FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO.

HACE CONSTAR:

Que, la Srta. **SOFIA NANCY CCALLO LAUCATA**, estudiante de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, Facultad de Odontología, ha realizado el trabajo de extraer el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña), en el equipo de Arrastre de vapor de agua, a partir del 13 al 23 de agosto del 2013, para la utilización en su investigación intitulada "CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESCENCIAL DEL *Minthostachys mollis* (Muña), FRENTE A LA ACTIVIDAD BACTERIA DE *Streptococcus mutans* y *porphyromonas gingivalis*"

Así consta en el informe Nro. 004-2013-LOPU-FIQ-UNA., procedente del laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la FIQ-UNA.

Se expide la presente constancia a solicitud de la interesada para los fines que estime por conveniente.

Puno C.U., 30 de Octubre de 2013



Walter B. Aparicio Aragón Ph. D.
DECANO
FACULTAD DE INGENIERIA QUIMICA
UNA - PUNO

C.c.
Archivo '13
WAA/rva

ANEXO 6



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO-PUNO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, DECANO DE LA FACULTAD DE MEDICINA HUMANA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

HACE CONSTAR

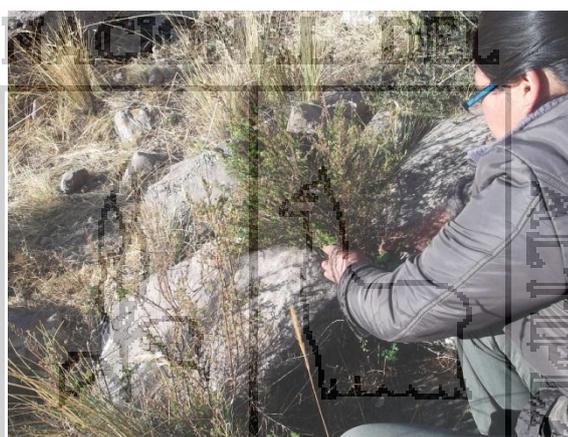
QUE LA SEÑORITA BACH. EN CIENCIAS DE LA ODONTOLOGIA, **SOFA NANCY CCALLO LAUCATA**, HA EJECUTADO SU TRABAJO DE TESIS TITULADO "CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESCENCIAL DEL *Minthostachys mollis* FRENTE A *Streptococos mutans*, Y *Porphyromonas gingivalis*", EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA HUMANA. EL MISMO QUE SE CONCLUYO SATISFACTORIAMENTE; EN EL PERIODO COMPRENDIDO DE AGOSTO A NOVIEMBRE DEL 2013.

SE LE EXPIDE LA PRESENTE A PETICION DE LA INTERESADA PARA FINES QUE VIERA POR CONVENIENTE.

PUNO, NOVIEMBRE DEL 2013.



DECANO **AMILIAN A. SALAS PORTOCARRERO**
DECANO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
UNA - PUNO

ANEXO 7**Fotografía 1. Muña (*minthostachys molli*)****Fotografía 2. Cortado de la muña****Fotografía 3. Secado de la muña**

Fotografia 4. Pesado de la muña



Fotografia 5. Hidrodestilador



Fotografia 6. Aceite esencial de la muña



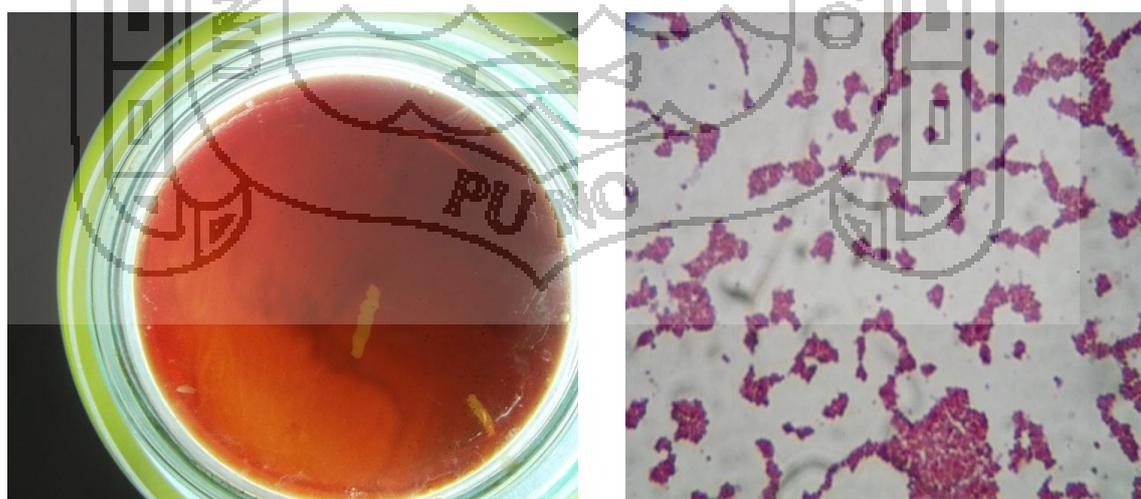
Fotografias 7. Estandarizacion de cepas



Fotografías 8. *Streptococcus mutans*



Fotografía 9. *Porphyromonas gingivalis*



Fotografía 10. Concentración Mínima Inhibitoria de *Streptococcus mutans* y
Porphyromonas gingivalis



Fotografía 11. Preparacion de tubo



Fotografía 12. Inoculacion de la cepas con el aceite esencial



1



2



3



4

Fotografía 13. Colocado en la estufa por 18 horas



Fotografía 14. Lectura del espectrometro para la CMI

