



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL
DE ODONTOLOGÍA**

Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial
de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano)
y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans*
ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746
y *Candida albicans* ATCC 90028

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE CIRUJANO DENTISTA

Presentada por

MARAVÍ INGA, GISELLA GIOVANNA

ASESORA

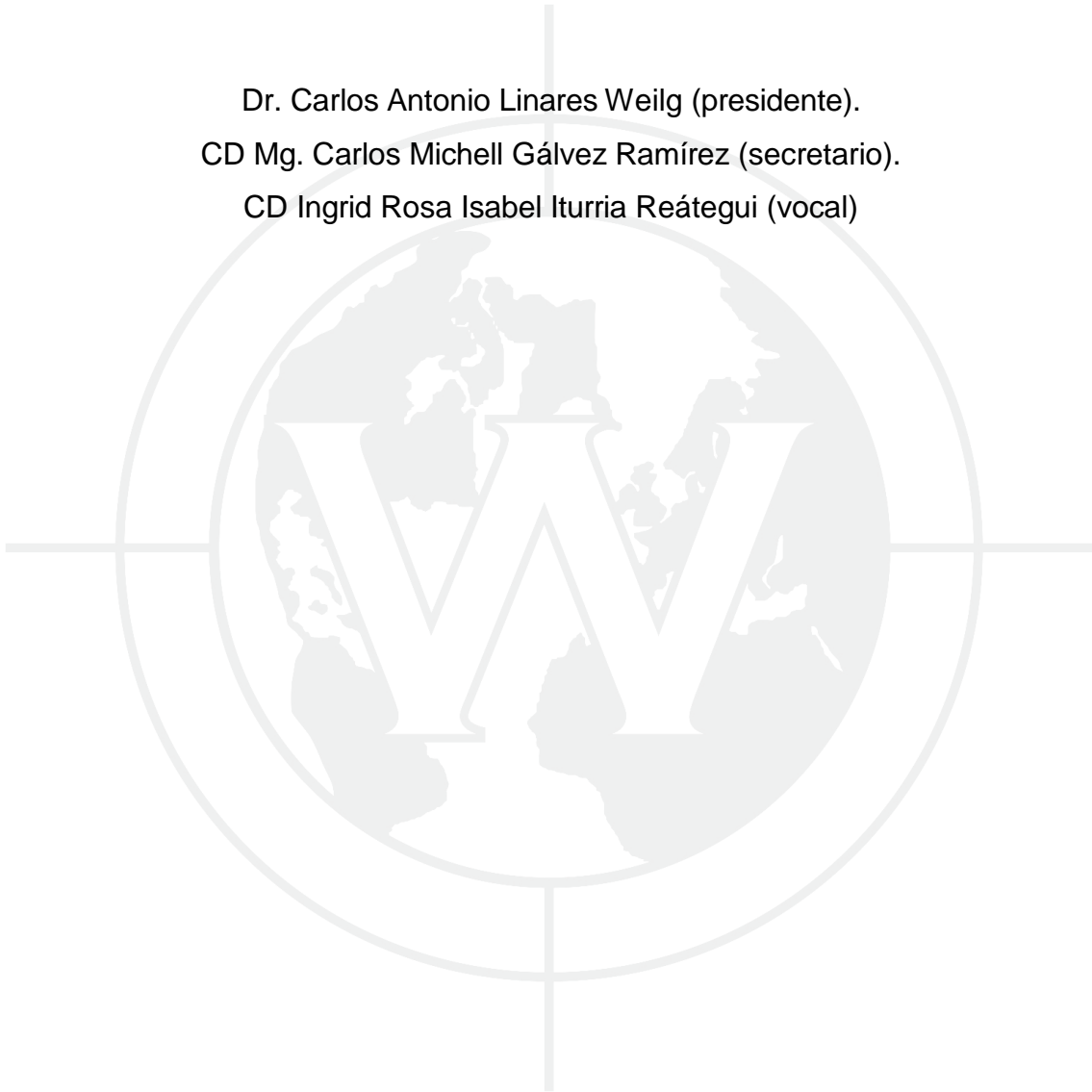
MG. CD DIANA ESMERALDA CASTILLO ANDAMAYO

Lima-Perú

2012

JURADO

Dr. Carlos Antonio Linares Weilg (presidente).
CD Mg. Carlos Michell Gálvez Ramírez (secretario).
CD Ingrid Rosa Isabel Iturria Reátegui (vocal)

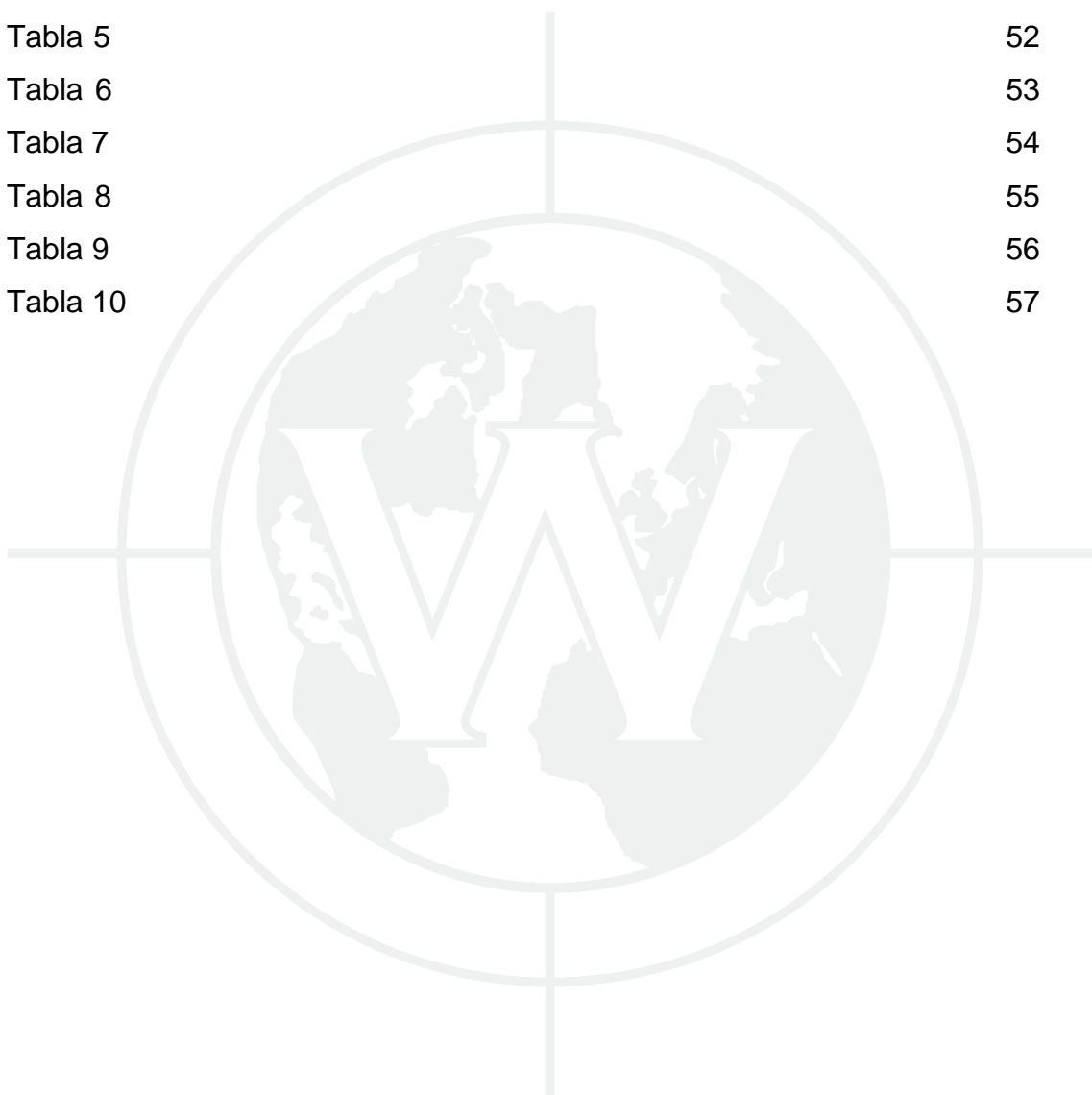


ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	07
1.1. Planteamiento del problema	07
1.2. Formulación del problema	08
1.3. Justificación	08
1.4. Objetivos	09
1.4.1. Objetivos generales	09
1.4.2. Objetivos específicos	09
II. MARCO TEÓRICO	11
2.1. Antecedentes	11
2.2. Base teórica	47
2.3. Terminología básica	32
2.4. Hipótesis	33
2.5. Variables	33
III. DISEÑO METODOLÓGICO	35
3.1. Tipo y nivel de investigación	35
3.2. Población y muestra	35
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	36
3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico	45
3.5. Aspectos éticos	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1. Resultados	47
4.2. Discusión	57
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
5.1 Conclusiones	61
5.2 Recomendaciones	62
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
VII. ANEXOS	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1	48
Tabla 2	49
Tabla 3	50
Tabla 4	51
Tabla 5	52
Tabla 6	53
Tabla 7	54
Tabla 8	55
Tabla 9	56
Tabla 10	57



RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antibacteriano y antifúngico *in vitro* del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) mediante el método de difusión en agar con disco, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. Los aceites esenciales de dichas plantas se obtuvieron por el método de arrastre por vapor de agua. Para realizar el análisis microbiológico se utilizó el aceite esencial de menta al 50 y al 100 %, de orégano al 50 y al 100 % y de hierba luisa al 50 y al 90 %. Asimismo, para obtener concentraciones al 50 y al 90 %, se diluyeron en agua destilada y DMSO (dimetilsulfóxido). Estos aceites esenciales fueron comparados con nistatina como control positivo (para los hongos) y gluconato de clorhexidina al 0,12 % (para las bacterias). Como controles negativos se utilizó H₂O destilada y DMSO. Al realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* se obtuvieron los siguientes resultados: de los tres aceites esenciales, el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el orégano. Frente a *Lactobacillus acidophilus* y a *Candida albicans* el mayor efecto lo tuvo la hierba luisa. El aceite esencial de orégano y hierba luisa tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos clorhexidina al 0,12 % y nistatina, a excepción de la *Mentha piperita* (menta) al 50 %, cuya acción fue menor que los controles positivos.

Palabras clave: aceite esencial; *Mentha piperita*; *Origanum vulgare*; *Cymbopogon citratus*; efecto antibacteriano; efecto antifúngico; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*; *Candida albicans*.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to determine the antibacterial and antifungal effect in vitro of the essential oil: *Mentha piperita* (Mint), *Origanum vulgare* (Oregano) and *Cymbopogon citratus* (Lemon grass) by using the agar diffusion method with disk, on *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 and *Candida albicans* ATCC 90028. The essential oils from these plants were obtained by the method of drag due to water vapor. For microbiological analysis, was used the essential oil of *Mint* to the 50 and 100 %, Oregano to the 50 and 100% and *Lemon grass* to 50% and 90 %, also for concentrations of 50% and 90%, they were diluted in distilled water and DMSO (dimethylsulfoxide). These essential oils, were compared with nystatin as a positive control (for the fungi) and chlorhexidine gluconate 0.12 % (for the bacteria) and as negative controls was used: H₂O distilled water and DMSO. When performing in vitro susceptibility testing yielded the following results: Of the three essential oils, which had a greater effect on *Streptococcus mutans* was Oregano, with *Lactobacillus acidophilus* and with *Candida albicans* was *Lemon grass*. Oregano essential oil and *Lemon grass* had more effective antibacterial and antifungal positive controls: 0.12% Chlorhexidine and Nystatin, *Mentha piperita* (Mint) 50% that their action was lower than positive controls.

Keywords: essential oil; *Mentha piperita*; *Origanum vulgare*; *Cymbopogon citratus*; antibacterial activity; antifungal activity; *Streptococcus mutans*; *Lactobacillus acidophilus*; *Candida albicans*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Planteamiento del problema

La caries dental es una de las enfermedades de etiología bacteriana más comunes entre los seres humanos¹, siendo el *Streptococcus mutans* el microorganismo más importante ligado a tal patología, considerado como la especie más frecuentemente aislada en la placa dentobacteriana². Asimismo, otros microorganismos, como *Lactobacillus acidophilus*, han sido asociados a la caries dental, ya que son capaces de producir grandes cantidades de ácidos en un pH bajo, resultando en una placa altamente ácida que favorece la desmineralización dental³.

A su vez, la cavidad bucal constituye un ambiente favorable para la colonización de microorganismos oportunistas como los hongos del género *Candida*, siendo la levadura *Candida albicans* el principal agente etiológico de la candidiasis oral⁴, por lo que se considera que cuatro de cada mil pacientes que acuden a una consulta odontológica presentan síntomas de infección candidiásica⁵.

En la actualidad, existe una gran variedad de agentes antimicrobianos (llamados colutorios). Entre estos está la clorhexidina al 0,12 %, como el agente más utilizado en el medio, dada su eficacia en la eliminación de microorganismos cariogénicos. Sin embargo, presenta efectos secundarios adversos, como disgeusia y tinción dental, razones que limitan su utilización⁶. De la misma manera, hay una gran cantidad de agentes antimicóticos; entre estos se tiene a la nistatina, de la que estudios han demostrado su acción eficaz frente a la candidiasis oral. No obstante, aún no se sabe cuál de estos antisépticos orales tiene mayores ventajas para el mantenimiento de la salud bucal, por lo que se cree necesario comprobar su verdadera eficacia⁷.

En consecuencia, es necesario evaluar otras sustancias a base de aceites esenciales de plantas naturales, los cuales son el producto del metabolismo secundario de las plantas aromáticas. Diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana,

antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida⁸.

Por consiguiente, existe la necesidad inmediata de trabajar en la prevención y en el tratamiento de la caries dental y de la candidiasis oral, a base de productos naturales de fácil implementación y de amplio espectro presentes en extractos de plantas, los cuales podrán estar al alcance de toda la comunidad por su fácil acceso, bajo costo y, sobre todo, por los pocos efectos colaterales indeseables⁹.

Por todo lo expuesto, el propósito de la presente investigación fue determinar cuál de estos aceites esenciales de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) tiene mejor efecto antibacteriano y antifúngico sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*, tanto en su forma concentrada como en la diluida.

1.2. Formulación del problema

¿Existirá efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028?

1.3 Justificación de la investigación

La presente investigación tiene importancia teórica y social, ya que aportará al conocimiento científico sobre la existencia de plantas medicinales con propiedades antibacterianas y antifúngicas, las cuales podrían ser alternativas de prevención y tratamiento de las patologías más frecuentes de la cavidad bucal, como la caries dental y la candidiasis oral. De esta manera, se podrían elaborar fármacos naturales que en su composición contengan compuestos químicos propios de estas plantas, gracias a las bondades de la medicina tradicional, generando así una variedad de productos de uso farmacéutico de origen natural propios de nuestra biodiversidad, los cuales tengan actividad antibacteriana y antifúngica sobre

microorganismos cariogénicos y hongos orales, permitiendo que las poblaciones de bajos recursos económicos puedan acceder a un menor costo a alternativas de tratamiento para el control de microorganismos relacionados con la caries dental y con la candidiasis bucal, como son los colutorios a base de aceites esenciales.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 100 % frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.

2. Determinar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y al 100 % y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 90 % frente a *Candida albicans*.

3. Comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 100 % con el colutorio bucal gluconato de clorhexidina al 0,12 % frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.

4. Comparar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), y *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y al 100 % y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 90 % con nistatina frente a *Candida albicans*.

5. Comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Mentha*

piperita (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 100 % con agua destilada y DMSO frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.

6. Comparar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y al 100 %, y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 90 % con agua destilada y DMSO frente a *Candida albicans*.



II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

- Bastos M y col. evaluaron la concentración bactericida mínima del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a 71 bacterias aisladas de leche bovina, de los géneros *Streptococcus* Gram (+), *Staphylococcus* Gram (-) y *Corynebacterium* Gram (+); y tres cepas patrón de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. El aceite esencial de *Origanum vulgare* no presentó efecto para *Pseudomonas Aeruginosa* Gram (-), pero se comprobó la actividad *in vitro* del aceite frente a las bacterias que pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium* (Bastos M y col. 2011)¹⁰.

- Rojas J, Solís H y Palacios O determinaron la actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro* de los aceites esenciales de diez plantas medicinales, entre ellas *Mentha X piperita* L. (menta), *Rosmarinus officinalis* L. (romero), *Chenopodium ambrosioides* L. (paico), *Eucaliptus globulus* Labill (eucalipto), *Artemisia absinthium* L. (ajenjo), *Melissa officinalis* L. (toronjil), *Minthostachys setosa* Brig (muña), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Aloysia triphylla* (cedrón) y *Mentha spicata* L. (hierba buena). Los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Aloysia triphylla* (cedrón) inhibieron significativamente el crecimiento de la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*, concluyendo que los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y de *Aloysia triphylla* mostraron actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro* (Rojas J, Solís H y Palacios O 2010)¹¹.

- De Souza L, Frascolla R, Santin R, Ziemann M, Costa R, Alves M *et al.* evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de tres tipos de extractos (un aceite, una tintura y una decocción) de las plantas *Origanum vulgare* L. (orégano) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo), frente a *Malassezia pachydermatis* (hongo), *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-) y *Staphylococcus aureus* Gram (+). Los aceites presentaron CMI menor frente a los microorganismos, pero las tinturas fueron las que presentaron mejor rendimiento. Se concluyó que tanto el aceite como la tintura pueden ser una alternativa para

el tratamiento de la otitis externa, debido a la presencia de timol y carvacrol en mencionadas plantas (De Souza L, Frascolla R, Santin R, Ziemann M, Costa R, Alves M *et al.* 2008)¹².

- Borja F evaluó la actividad antibacteriana de *Cymbopogon citratus* a través del método de difusión en agar, para, a su vez, hallar la CMI mediante el método de microdilución frente a *Streptococcus mutans*. Se encontró que la CMI fue de 0,4 %. y los halos de inhibición de 21,8 mm y 23 mm en 80 uL/mL y 160 uL/mL del aceite esencial. Se concluyó que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* es un buen agente antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* y su acción es más efectiva que el control positivo, clorhexidina 0,12 % (Borja F 2007)¹³.

- De la Paz J, Maceira M, Corral A, González C quisieron comprobar si la decocción de las hojas de *Mentha piperita* Linn posee efecto antiparasitario. El modelo biológico utilizado fue la lombriz terrestre del género rojo California, y las dosis empleadas fueron 0,475; 0,950 y 1,900 g/dL. Además, se formaron un grupo control negativo (agua destilada) y un grupo control positivo (solución de piperazina al 2,0 %). La evaluación, en placa Petri, se realizó de forma continua durante un período de ocho horas. La variable medida fue tiempo de supervivencia y se expresó en minutos. Los resultados demostraron que la decocción de las hojas de *Mentha piperita* Linn posee efecto vermífugo en dependencia de la dosis. La dosis máxima resultó ser más potente que la droga de referencia empleada, piperazina 2,0 % (De la Paz J, Maceira M, Corral A, González C 2006)¹⁴.

- García C evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro extractos vegetales (perejil, ruda, tomillo y gobernadora) y dos aceites esenciales (clavo y orégano), frente a cepas hospitalarias con resistencia múltiple de *Staphylococcus aureus* Gram (+) y una cepa de referencia (ATCC 25923), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de macrodilución. En las pruebas de actividad antibacteriana, los resultados mostraron que no existió diferencia entre las concentraciones mínimas inhibitorias de los extractos vegetales en todas las cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a concentraciones mínimas inhibitorias variables e inferiores a las de

los extractos (García C 2006)¹⁵.

- Guerra M y col. evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, así como de una crema elaborada a partir del mismo. Se empleó el método de diluciones en medio líquido. Se determinó la concentración mínima inhibitoria y mínima microbicida frente a microorganismos de interés clínico humano. El aceite mostró una notable actividad antifúngica, superior a la que se observó con la crema, lo que justifica el uso tradicional de esta planta. La formulación desarrollada resultó no irritante, y se propuso usar como antidermatofítica. La especie microbiana más sensible resultó ser *Trichophyton rubrum* (Guerra M y col. 2004)¹⁶.

- Bankole S y Joda A determinaron el potencial de utilizar el polvo y el aceite esencial de las hojas secas de *Cymbopogon citratus* frente a cuatro especies de hongos: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tamarii* y *Penicilium citrinum*. Se aplicaba directamente a los hongos en forma de aerosoles por un período de cuatro meses, durante los que se observó una disminución de ellos (Bankole S y Joda A 2004)¹⁷.

- Hernández L y Rodríguez M evaluaron la actividad antimicrobiana de tres especies vegetales: *Ocimum basilicum* L. (albahaca), *Ocimum tenuiflorum* L. (albahaca tailandesa) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), frente a cuatro bacterias Gram (+), ocho bacterias Gram (-), levadura y un hongo dermatofito. La actividad antimicrobiana de *Cymbopogon citratus* quedó demostrada frente a *Bacillus subtilis* Gram (+), *Proteus vulgaris* Gram (-) y el hongo *Trichophyton mentagrophytes* (Hernández L y Rodríguez M 2001)¹⁸.

- Alzamora L, Morales L, Armas L y Fernández G evaluaron la actividad *in vitro* de los aceites esenciales de cinco plantas aromáticas: *Eucalyptus globulus* (eucalipto), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Tagetes pusilla* Lag (anís serrano), *Senecio tephrosioides* (huamanripa) y *Lepechinia meyenii* (salvia) sobre diez microorganismos: *Salmonella* Gram (-), *S. typhimurium* Gram (-), *S. enteritidis* Gram (-), *Vibrio cholerae* Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-), *Shigella flexneri* Gram (-), *Staphylococcus aureus* INS Gram (+), *S. aureus* y *Candida albicans*. Utilizaron discos, los cuales fueron impregnados con 5 mL de aceite esencial puro. Posteriormente, se realizó

la medición de los halos de inhibición: el aceite esencial que ejerció mayor efecto sobre los microorganismos evaluados fue el de hierba luisa (88,8 %), y el de menor grado fue el de eucalipto. Sin embargo, ninguno de los cinco aceites empleados inhibió a *Pseudomonas aeruginosa* (Alzamora L, Morales L, Armas L y Fernández G 2001)⁸.

- Albado E, Sáez G y Grabiél S determinaron la actividad antimicrobiana en el aceite esencial de *Origanum vulgare*. El aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua a partir de las hojas y flores desecadas de (*O. vulgare*); se evaluaron las bacterias Gram (-) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae*; y las bacterias Gram (+) *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, que mostraron diferentes grados de sensibilidad. Concluyendo que el aceite esencial de *Origanum vulgare* posee actividad microbiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto para *Pseudomonas aeruginosa* (Albado E, Sáez G y Grabiél S 2001)¹⁹.

- Hammer K, Carson C y Riley T realizaron un estudio sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de 52 plantas, incluyendo a *Cymbopogon citratus*, frente a diez microorganismos: *Acinetobacter baumannii* Gram (-), *Aeromonas sobria* Gram(-), *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* Gram (+), *Escherichia coli* Gram (-), *Klebsiella pneumoniae* Gram (-), *Pseudomonas aeruginosa* Gram(-), *Salmonella typhimurium* Gram (-), *Serratia marcescens* Gram (-) y *Staphylococcus aureus* Gram (+), en el que encontraron la CMI para cada una de las plantas frente a dichos microorganismos. Para el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* se encontró una CMI frente a *Staphylococcus aureus* de 0,6 % (Hammer K, Carson C y Riley T 1999)²⁰.

2.2. Base teórica

Caries dental

Es una enfermedad infecciosa, multifactorial y transmisible que afecta los tejidos dentarios, caracterizada por la desintegración progresiva de sus

tejidos calcificados, debido a la acción de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta²¹.

Incidencia

En el Perú, según el Ministerio de Salud (Minsa), 98 de cada 100 peruanos presenta lesiones cariosas. La caries dental todavía es considerada como un problema de salud pública en muchas partes del mundo, debido a que afecta la calidad de vida de los individuos que la padecen^{1,3}.

Factores etiológicos

Paul Keyes, en 1960, estableció que la etiopatogenia de la caries obedece a la interacción simultánea de tres factores principales: un factor “microorganismo” que, en presencia de un factor “sustrato” (ingesta de carbohidratos), logra afectar a un factor “diente” (también denominado huésped). Dicho investigador refirió, tanto en forma teórica como experimental, que la interacción entre estos tres factores constituye la base fundamental para el desarrollo de la caries dental²².

A continuación, se detallará cada uno de ellos:

a) Microorganismos

La cavidad bucal contiene una de las más variadas y concentradas poblaciones microbianas del organismo. Se estima que en ella habitan entre 200 y 300 especies. Entre las bacterias presentes en la boca se encuentran tres especies principalmente relacionadas con la caries: *Streptococcus* (con las subespecies *S. mutans* y *S. sobrinus*), *Lactobacillus* y *Actinomyces*. De todas ellas, los *S. mutans* son los más cariogénicos, capaces de inducir caries en cualquier superficie del diente^{21,23}.

b) Dieta

El *Streptococcus mutans*, para poder producir glucano y polisacáridos (responsables de la adhesión bacteriana) necesita de un sustrato, que consiste en la ingesta de hidratos de carbono, más específicamente la sacarosa, que es el carbohidrato fermentable con mayor potencial cariogénico. Durante el proceso de la caries, las bacterias orales fermentan los hidratos de carbono y producen ácidos que disuelven el esmalte dentario^{21,24}.

La forma (consistencia, textura, adhesión) y la frecuencia del consumo son más importantes que la cantidad de azúcares consumidos. El pH en boca cae por debajo de 5,5 (valor crítico que favorece la desmineralización del esmalte, a los 3-5 minutos después de la ingesta, y tarda de 30 a 60 minutos en alcanzar un pH neutro de 7,0). Se ha demostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, la persistencia de la acidez favorece la disolución o desmineralización, mientras que la reducción del tiempo de exposición estimula la remineralización²⁴.

c) Huésped

Los factores ligados al huésped pueden distribuirse en dos grandes grupos: la saliva y los dientes.

- **La saliva**

La participación de la saliva en el proceso carioso ha sido corroborada mediante estudios diversos, en los cuales, al disminuir el flujo salival, se observó un incremento sustancial de los niveles de lesiones de caries. Entre ellos, los realizados en pacientes con xerostomía, es decir, niveles de secreción salival disminuidos, y el experimento de supresión de saliva en animales, mediante extirpación quirúrgica de sus glándulas²¹.

- **Los dientes**

La caries dental se manifiesta en el esmalte, el cual se torna susceptible de ser destruido por los ácidos o por su propia configuración anatómica, como en

los casos de surcos, fisuras y puntos²⁵.

Posteriormente, Newbrun (1978) añadió el factor “tiempo” como cuarto factor etiológico²¹.

- **Tiempo**

Se considera que una frecuencia de carbohidratos por encima de seis veces diarias contribuye a aumentar el riesgo de caries. Además, algunos estudios muestran que las diferencias en el factor cariogénico de los alimentos no solo depende de la cantidad de carbohidratos fermentables que estos contengan, sino también de la frecuencia del consumo y la permanencia de los mismos en la boca²⁴.

Microorganismos relacionados con la caries dental

El papel esencial de los microorganismos en la etiología de la caries fue instituido por Miller (1890). A ello se sumó la identificación de las bacterias sindicadas como las principales: el *Streptococcus mutans* (Clarke 1924) y los *Lactobacillus* (Buntig y Palmerlee 1925)²¹.

A continuación se describirán cada uno de estos microorganismos, con sus características más importantes.

Streptococcus mutans

Streptococcus mutans son cocos Gram positivos dispuestos en cadenas cortas de cuatro a seis cocos, los cuales miden de 0,5 a 0,8 μ de diámetro, anaerobios facultativos, comprenden parte de la flora microbiana residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas. Su temperatura óptima de desarrollo es de 36 \pm 1 °C^{26,27}.

Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, ya que se puede encontrar en forma de coco o de forma más alargada, como bacilo²⁴.

Hábitat

Su principal hábitat es la superficie dentaria del hombre¹¹. Se encuentra en forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debida fundamentalmente a que requiere la presencia de tejido duro no descamativo para su colonización²⁸.

Medio de cultivo

Para el cultivo de *Streptococcus mutans* se empleó el medio de cultivo infusión de cerebro-corazón (BHI). Dicho medio es el más empleado y el más eficaz para el cultivo de bacterias exigentes, como *Estreptococos*, *Neumococos*, *Meningococos* y otras²⁹.

Poder patógeno

La relación *S. mutans*-caries se fundamenta en las siguientes características: incremento cuantitativo en sujetos predispuestos o con caries activa; capacidad de inducción de la enfermedad en animales de experimentación y protección de los mismos cuando estén inmunizados frente a antígenos del microorganismo y los factores de virulencia relacionados con dichos procesos²⁷.

Factores de virulencia

Son aquellas condiciones o características específicas que hacen patógeno a este microorganismo. Entre ellas están las siguientes²⁴:

- **Acidogenicidad:** el *Streptococcus* puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.
- **Aciduricidad:** es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.

- **Acidofilicidad:** el *Streptococcus mutans* puede resistir la acidez del medio. Los *Streptococcus mutans* están relacionados con la caries que ocurren en fisuras, en superficies lisas o sobre el cuello y raíz. Los altos grados de infección por *Streptococcus mutans* elevan el riesgo de padecer caries²⁴.

Lactobacillus acidophilus

Incluido en la familia *Lactobacillaceae*, se distinguen más de cuarenta especies. Desde el punto de vista de su morfología, los lactobacilos son pleomórficos, pero debido a que se dividen en un solo plano, nunca presentan ramificaciones. Suelen aparecer asociados en parejas, cadenas, empalizadas o frecuentemente aislados. En cuanto a los cultivos, la temperatura óptima es de 36± 1 °C, y existe un medio líquido o sólido muy selectivo²⁰. Son bacilos Gram positivos, catalasa negativa, no esporulados. Las colonias generalmente son pequeñas, pueden variar en su forma: opaca, redonda, lisa aplanada, translúcida e irregular, frecuentemente con aspecto de cristal. Los *Lactobacillus* no solo existen constantemente en la boca y producen rápida conversión de carbohidratos en ácido láctico, sino que su índole ácida permite que persistan en tales valores de acidez. Por lo tanto, se ha sospechado que pueden guardar relación causal con el proceso de la caries¹.

Hábitat

Con respecto a su hábitat, las especies del género *Lactobacillus* se encuentran en forma constante en la cavidad bucal, la vagina y el aparato digestivo humano y de otros mamíferos. En la cavidad oral, se aíslan preferentemente en la saliva, el dorso de la lengua y las placas supragingivales y radiculares. Su concentración variará según el estado de salud oral, incrementándose con la caries²⁷.

Medio de cultivo

Para el cultivo y recuento de lactobacilos, se empleó agar (MRS).

Los investigadores Man, Rogosa y Sharpe desarrollaron este medio con el propósito específico de emplearlo para el cultivo de lactobacilos en productos derivados de la leche, aunque no por esto dejar de estar indicado en otras aplicaciones. Por la presencia de la peptona, glucosa, manganeso y magnesio se aportan los componentes nutritivos y energéticos para el crecimiento de los *Lactobacillus*²⁹.

Poder patógeno

Los *Lactobacillus* se relacionan con la caries, pero tienen, en principio, por la falta de algunos factores de cariogenicidad, como su poder adhesivo, una menor significación patogénica que los *Streptococcus* del grupo *mutans*. Su poder cariogénico es mayor en zonas retentivas, en las que quedan atrapados físicamente. En cualquier caso, su cantidad en la saliva aumenta en caries activas o en sujetos predispuestos²⁷.

Son grandes productores de ácido láctico y se encuentran entre las bacterias más acidófilas que se conocen. Son capaces de producir ácidos en un pH muy bajo. Su poca afinidad por las superficies dentarias hace que no se les relacione con lesiones de caries de esmalte; no obstante, son los primeros implicados en el avance de la caries de la dentina. Actúan principalmente como “invasores secundarios” que aprovechan las condiciones ácidas y la retentividad existente en la lesión cariosa y dependen fundamentalmente de la acción anterior de los *Streptococcus mutans*. El *Lactobacillus acidophilus* es asociado con una frecuente ingesta de carbohidratos³⁰.

Candidiasis bucal

Las candidiasis son las infecciones micóticas orales más frecuentes, que se manifiestan en forma de manchas de color blanco rosado sobre la lengua, encías, mucosa oral o comisuras de los labios. Puede ser asintomática o producir dolor, ardor o mal sabor de boca²⁸.

Tipos de candidiasis bucal

La candidiasis bucal se divide en dos amplias categorías: primaria y secundaria⁵:

Candidiasis primaria

Es aquella confinada a los tejidos bucales y peribucales. Se subdivide en las siguientes:

- a) Candidiasis pseudomembranosa (aguda y crónica).
- b) Candidiasis eritematosa (aguda y crónica).
- c) Candidiasis hiperplásica (leucoplasia).
- d) Lesiones asociadas: estomatitis protésica, queilitis angular, glositis rómbica.

Candidiasis secundaria

En la que la candidiasis bucal es una manifestación de infección sistémica o generalizada.

Candidiasis mucocutánea crónica (CMC): llamada también “síndrome crónico de candidiasis mucocutánea”, incluye CMC familiar, CMC difusa, CMC por endocrinopatía. Asimismo, se habla de candidiasis crónica multifocal cuando hay dos o más formas clínicas de aparición conjunta, como queilitis y estomatitis protésica.

Factores que facilitan la infección candidiásica

C. albicans puede producir una infección localizada y limitada a la mucosa bucal, pero puede extenderse, en casos graves, a la faringe y al esófago e, incluso, producir una infección diseminada. Entre los factores que facilitan la infección candidiásica se destacan a) la cantidad y el tipo de saliva (p. ej., sequedad bucal o gran humedad en las comisuras labiales);

b) la dieta; c) el pH; d) la temperatura; e) la presencia de algunas bacterias o de prótesis dental, ya que el acrílico de las prótesis removibles es un material fácilmente colonizable; f) el tratamiento con antibióticos y g) los corticosteroides y cualquier tipo de inmunodepresión primaria o adquirida⁵.

Manifestaciones de candidiasis bucal

Las manifestaciones de la candidiasis bucal varían de acuerdo con el tipo de lesión; la más común es la infección pseudomembranosa (conocida también como algodoncillo). Esta lesión se presenta clásicamente como semiadherida, blanco-amarillenta, blanda, cremosa, con aspecto de gotas y áreas de pseudomembranas que confluyen y pueden ser removidas con una gasa o un bajalenguas, dejando una superficie roja sangrante.

Esta condición está asociada con una supresión inicial y progresiva del sistema inmune. La afección es usualmente aguda, pero sin tratamiento persiste por varios meses y adopta un curso crónico. Puede involucrar cualquier área de la mucosa bucal, pero es más frecuente en la lengua, el paladar duro y blando y la mucosa del carrillo⁵.

Microorganismos relacionados con la candidiasis bucal

La gran mayoría de las candidiasis bucales están producidas por levaduras del género *Candida*, principalmente por la especie *Candida albicans*. Se considera que cuatro de cada mil pacientes que acuden a una consulta dental general presentan síntomas de infección candidiásica. Además, una gran parte de las candidiasis orales son asintomáticas y es muy probable que la prevalencia de este proceso sea mucho mayor²⁷.

A continuación se detallan las características más resaltantes de esta levadura:

Características generales

La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar. Todas las levaduras son Gram positivas. El género *Candida* comprende más de 150 especies de levaduras pero *C. albicans* se observa generalmente como una célula oval levaduriforme de dos a cuatro micrómetros, con paredes finas; no obstante, se han encontrado en tejidos infectados formas filamentosas de este hongo, las cuales poseen longitud variable y presentan extremos redondos, cuyo tamaño oscila entre tres y cinco micrómetros de diámetro; y pseudohifas, que son células alargadas de la levadura que permanecen unidas entre sí^{5,19}.

Hábitat

Las especies del género *Candida* colonizan el ser humano y otros animales de sangre caliente, por lo que se encuentran en los ambientes naturales. El lugar primario de colonización es el tubo digestivo desde la cavidad bucal hasta el recto³¹.

Medio de cultivo

El medio de cultivo de hongos más recomendado, y el que se empleó, fue agar dextrosa de Sabouraud. El contenido de glucosa y el pH bajo de este medio facilitan el rápido desarrollo de los hongos y levaduras presentes en la muestra³².

Poder patógeno

Candida albicans en principio no es patógena, ya que la flora bacteriana beneficiosa y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así un equilibrio. Pero cuando se rompe este equilibrio, *Candida albicans* empieza a proliferar y puede dar lugar a un conjunto de enfermedades denominadas candidiasis o micosis candidiásica, que pueden consistir en leves infecciones de mucosas y piel o desencadenar

diseminaciones sistémicas graves, pudiendo afectar órganos vitales²⁸.

La fitoterapia

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico.

Las plantas han sido utilizadas desde épocas primitivas en el tratamiento de enfermedades. La mayoría de estas presentan efectos fisiológicos múltiples, debido a la presencia de más de un principio activo³³.

Plantas medicinales

Como planta medicinal se conoce a cualquier planta que en uno o más de sus órganos contienen sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursoras para la síntesis químico-farmacéutica. La etnobotánica trata del conocimiento botánico de las plantas por parte de las comunidades indígenas, y comprende una estrecha relación entre las plantas y las personas que las utilizan³⁴.

El uso de las plantas es de gran utilidad, ya que de ellas son obtenidas innumerables sustancias químicas. En la actualidad existen plantas que poseen compuestos químicos antibacterianos y antifúngicos que pueden utilizarse en el campo de la odontología.

Mentha piperita (menta)

Clasificación botánica³⁵

Phylum:	<i>Euphyta.</i>
División:	<i>Angiospermae.</i>
Clase:	<i>Dicotyledones.</i>
Orden:	<i>Tubiflorae.</i>
Familia:	<i>Labiatae.</i>
Género:	<i>Mentha.</i>

Especies: *Mentha piperita*.

Características

Es una especie herbácea, vivaz, con tallos erectos, cuadrangulares muy ramificados, que puede alcanzar una altura de 80 cm. Nace de un rizoma subterráneo, del que brota un extenso sistema radicular. Hojas opuestas pecioladas, lanceoladas o agudas, con bordes aserrados, color verde oscuro en la cara superior y más claro en la inferior. Flores agrupadas en tirso densos color púrpura. Los estolones son de sección cuadrangular y crecen bajo y sobre la superficie del suelo en todas direcciones³⁶.

Etimología

El nombre del género *Mentha* proviene del latín 'mintha' o 'minta', nombre de una ninfa de la mitología griega, hija de Cocito (humo del infierno), amada por Plutón (Hades) y a quien, por celos de Proserpina, transformaron en una planta de menta. El epíteto *piperita* se refiere a su sabor picante³⁷.

Hábitat y distribución

Es oriunda de Europa, pero se puede encontrar con facilidad en todo el mundo, prefiriendo los climas templados a los calurosos o fríos. Es una planta que puede ser cultivada en huertos, jardines o campos; crece espontáneamente en tierras profundas, ricas en humus y con bastante humedad³⁸.

Usos

- Sus hojas son usadas frescas o desecadas, en preparación de infusiones digestivas o jarabes.
- Como aromatizante y saborizante utilizado en licorería, gastronomía, pastelería, repostería y confitería.

- En perfumería y cosmética, en la preparación de líquidos, polvos y pastas dentífricas.
- Forma parte de numerosos preparados medicinales, como tabletas, tinturas, bálsamos, elixires, ungüentos, otros³⁶.

Composición

Aceite esencial (2 a 3 %) rico en mentol, mentona; flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lactona triterpénica y otras sustancias³⁷.

Principios activos y propiedades

El aceite esencial de menta tiene como componente principal al mentol, en una proporción de 45-70 %, siendo el elemento que le da el olor tan característico y que le confiere además sus propiedades farmacológicas. Estudios etnobotánicos reconocen su efecto como astringente, carminativo, antiséptico, estimulante, anodino, espasmolítico, vermífugo, antiviral, antifúngico, antibacteriano y antiinflamatorio^{14,36}.

Origanum vulgare (orégano)

Clasificación botánica³⁹

Phylum:	<i>Euphyta.</i>
División:	<i>Angiospermae.</i>
Clase:	<i>Dicotyledones.</i>
Orden:	<i>Tubiflorae.</i>
Familia:	<i>Labiatae.</i>
Género:	<i>Origanum.</i>

Características

El orégano perteneciente al género *Origanum*, familia *Labiatae*. Agrupa plantas herbáceas, perennes, matosas, originarias de los países mediterráneos. Crece espontáneamente en los lugares soleados y áridos hasta

2000 msnm. Es cultivada como planta aromática y por sus propiedades terapéuticas.

Etimología

El nombre deriva del griego "oros = montaña" y de "gamos = resplandor, delicia", es decir, "alegría de la montaña", porque al estado espontáneo pinta con sus flores las pendientes montañosas y ondulados pedregosos y soleados³⁹.

Hábitat y distribución

Origanum vulgare L. (orégano) es una planta perenne, perteneciente a la familia *Lamiaceae*. Originario de la región del Mediterráneo, también cultivado en Europa, Asia y Taiwán y en América del Sur. Su principal productor es Chile, pero también es producido en Bolivia, Perú, y, en menor escala, en Argentina y Uruguay³⁹.

Usos

La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos, sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores⁴⁰.

Composición

El orégano presenta como componente principal un aceite esencial, con más de 34 compuestos activos, de los cuales los fenoles (como carvacrol, timol, ã-terpeno y p-cimeno) pueden alcanzar entre 80,2 y 98 % de la composición del aceite¹⁰.

Principios activos y propiedades

El orégano (*Origanum vulgare*) posee propiedades antioxidantes,

antifúngicas, antiespasmódicas, antisépticas, y, sobre todo, se caracteriza por la potente acción de sus principios activos, carvacrol y timol, que le otorgan a esta planta un gran poder antibacteriano³⁹.

***Cymbopogon citratus* (hierba luisa)**

Clasificación botánica⁴¹

Reino:	<i>Cormobionta.</i>
División:	<i>Magnoliophyta.</i>
Clase:	<i>Liliatae (Liliopsida).</i>
Sub-clase:	<i>Commelinidae.</i>
Orden:	<i>Cyperales.</i>
Familia:	<i>Poaceae (gramíneas).</i>
Género:	<i>Cymbopogon Spreng.</i>
Especie:	<i>Citratus Stapf.</i>

Características

La hierba luisa es una planta herbácea muy vigorosa. Su tamaño es mediano; la altura máxima a la cual llega es de 1,50 hasta 2 m, un diámetro de 5 cm. Arbusto, ocasionalmente con porte arbóreo, de hasta tres metros de altura, muy aromático cuando se restriegan sus hojas, ramificado y desprovisto de pelos. Tallos redondos, leñosos, provistos de finas rayas longitudinales. Sus hojas son simples, lanceoladas, de limbo entero, brevemente pecioladas, enteras con ápice agudo, generalmente reunidas en grupos de tres. Las flores son pequeñas, blancas y se agrupan en espigas terminales. El fruto es una drupa con dos semillas. El material más característico posee un olor cítrico, limonado y algo herbáceo. El sabor es algo acre, pero con fuerte reminiscencia a la nota de limón fresco, verde^{41,42}.

Hábitat y distribución

La hierba luisa es originaria de la India, regiones de Asia suroriental y África

ecuatorial. Se encuentra distribuida en zonas tropicales, subtropicales y templadas⁴¹.

Usos

Las hojas de hierba luisa se usan como digestivas, diuréticas y antiespasmódicas; problemas respiratorios, como ansiolítico y contra el insomnio. La infusión de las hojas se utiliza para nerviosismo, histerismo, opresión del corazón, y para combatir las mordeduras de los animales venenosos. Es una especie de amplio uso en alimentación, tanto en América como en Europa occidental. Las hojas frescas se emplean como saborizante: por su aroma limonado se usan en ensaladas de frutas, jaleas, postres y como un aditivo en bebidas heladas. La esencia de esta planta ha sido utilizada esporádicamente en perfumería, aunque en la actualidad existen ciertas limitaciones en cuanto al contenido aceptable para su empleo⁴².

Composición

El componente principal del aceite esencial de hierba luisa es el citral, el cual es un aldehído que se encuentra entre un 70 a 85 %⁴¹.

Principios activos y propiedades

En cuanto a otros compuestos identificados, destacan los siguientes: geraniol, nerol, farnesol, citronelol, linalol, citronelal, limoneno y mirceno. Posee propiedades como antihipertensivo, antiespasmódico, antiasmático, antimicótico, antibacteriano, anticatarral, antifebril, carminativo, diaforético, expectorante, ansiolítico, antipalúdico y analgésico⁴¹.

Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias orgánicas químicamente constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que se localizan en determinados órganos de la planta, como flores, hojas, frutos; se les obtienen por destilación, dependiendo del método y de la condición

del vegetal, destacándose entre ellos el de arrastre con vapor de agua²⁶.

Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia, que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos porque, al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel, estas se volatilizan fácilmente, sin dejar ninguna huella ni mancha grasosa⁴³.

Propiedades físicas de los aceites esenciales

En general, son líquidos a temperatura ambiente. Su densidad es inferior a la del agua. Poseen un índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada. Son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua^{11,43}.

Composición química

Actualmente se han identificado alrededor de cuatrocientos componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales. La mezcla compleja que integra los aceites esenciales pertenecen de manera casi exclusiva a grupos característicos distintos: el grupo de los terpenos, el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano, los terpenos originarios del ácido acético, los terpenos provenientes del ácido chi químico (aromáticos) y otros, como los compuestos procedentes de la degradación de terpenos.

Los monoterpenos y sesquiterpenos son terpenos de 10 y 15 átomos de carbonos. De acuerdo con su estructura, se les clasifica, según el número de ciclos, como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc. Algunos ejemplos de monoterpenos y sesquiterpenos son los siguientes⁴³:

- Monoterpenos acíclicos: linalol, nerol, geraniol.
- Monoterpenos monocíclicos: p-mentano, 1,4- cineol, 1,8-cineol, ascaridol.
- Monoterpenoides bicíclicos: carano, cis-carano y trans-carano.
- Sesquiterpenos: farnesol, nerolidol.

Los monoterpenos son los compuestos mayoritarios de los aceites

esenciales³³.



Métodos de extracción de aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden obtener de diversas formas, ya que depende del órgano de la planta del cual van a ser extraídos, además de que en el momento de ser extraído, el aceite no pierda sus características organolépticas, ni sus propiedades. Los procesos pueden ser destilación con vapor de agua, expresión en frío, enfleurage, o extracción con solvente⁴¹.

Destilación con vapor de agua

La destilación por arrastre con vapor también es conocida como hidrodestilación (HD), y tiene como propósito separar sustancias volátiles e insolubles en agua de otras sustancias menos volátiles. El líquido hierve antes de alcanzar su punto de ebullición, debido a que la presión de vapor del líquido, más la presión de vapor de agua, son superiores a la presión atmosférica, dando lugar al proceso de destilación. La HD es el método más utilizado para extraer aceites esenciales. El método es sencillo. El agua en la cual se encuentra el material vegetal fresco pasa a través de una trampa de destilación en forma de vapor. Este vapor producido arrastra los aceites esenciales de las plantas hasta el refrigerante, el cual se encuentra a temperatura más fría. Este cambio de temperatura hace que el vapor se condense y se vuelva nuevamente líquido (agua y aceite esencial). En uno de los brazos de la trampa se puede observar cómo queda el agua y, sobre este, el aceite, lo cual facilita el momento de la recolección. El aceite debe ser almacenado en frascos de vidrios herméticos oscuros⁴¹.

Expresión en frío

Este método se utiliza para extraer el aceite esencial de los frutos de los cítricos, los cuales no soportan las altas temperaturas de la destilación. Mediante una esponja mojada con etanol que tiene alfileres, se debe picar la cáscara de los frutos. Va a ir adsorbiendo el aceite. Posteriormente, se procede a la separación aceite-etanol mediante destilación al vacío⁴¹.

Enfleurage

Es muy usado para extraer el aceite esencial de las flores. Se colocan las flores en medio de dos placas de vidrio, las cuales se encuentran con gasa. Se dejan estas placas a temperatura ambiente durante un mes. Cada semana se debe cambiar las flores⁴¹.

Extracción con solvente

Con este proceso se pone en contacto el aceite con el solvente (éter etílico, hexano, benceno). Posteriormente, se elimina el solvente a presión reducida y se purifica el aceite con alcohol absoluto. Debido a que son volátiles, se los debe almacenar en lugares frescos (preferiblemente a bajas temperaturas), oscuros (ya que son muy sensibles a la luz) y dentro de frascos herméticos, que deben ser de vidrio y de color oscuro⁴¹.

2.3. Terminología básica

- **Caries dental:** proceso destructivo que causa la descalcificación del esmalte dental y conduce a una destrucción continuada del esmalte y de la dentina, y a la cavitación del diente⁴⁴.
- **Etiología:** ciencia que trata de las causas de la enfermedad⁴⁴.
- ***Streptococcus mutans:*** es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, que se encuentra normalmente en la cavidad bucal humana, formando parte de la placa o *biofilm* dental. Se asocia al inicio y desarrollo de la caries dental¹.
- ***Lactobacillus:*** bacteria del ácido láctico. Es un género de bacterias Gram positivas anaerobias, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte lactosa y otros monosacáridos en ácido láctico¹.
- ***Candida albicans:*** hongo germinal semejante a las levaduras y presente habitualmente en las membranas mucosas del tracto genital femenino y los tractos respiratorios y gastrointestinales (incluida la cavidad oral). Puede asumir un papel patogénico en la producción de

candidiasis oral, o sistémico, como muguet o moniliasis⁴⁵.

- **Placa bacteriana:** película fina y blanda de detritus alimentarios, mucina y células epiteliales muertas depositadas sobre los dientes, que proporciona crecimiento para varias bacterias. Contiene calcio, fósforo y otras sales, polisacáridos, proteínas, hidratos de carbono y lípidos. La placa interviene en el desarrollo de la caries, cálculos dentales y enfermedades periodontales y gingivales⁴⁴.

2.4. Hipótesis

- Los aceites esenciales de *Mentha piperita* (menta), de *Origanum vulgare* (orégano) y de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 100 % poseen efecto antibacteriano sobre cepas aisladas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.
- Los aceites esenciales de *Mentha piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y al 100 %, y de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y 90% poseen efecto antifúngico sobre cepas aisladas de *Candida albicans*.

2.5. Variables

- **Variable independiente**

Sustancias experimentales:

- Aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) al 50 y 100 %.
- Aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y 100 %.
- Aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y 100 %.
- Colutorio bucal gluconato de clorhexidina al 0,12 %: control (+).
- Nistatina: control (+).
- H₂O destilada: control (-).
- DMSO (dimetilsulfóxido): control (-).

- **Variable dependiente**

Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y al 100 %, y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 90 %.

Operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADOR	TIPO	ESCALA	VALORES
Sustancias experimentales (variable independiente)	Líquidos aplicados en placas de agar	Cualitativa	Nominal	. Aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> (menta) al 50 % y 100 % . Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (orégano) al 50 % y 100 % . Aceite esencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa) al 50 % y 90 % . Colutorio bucal gluconato de clorhexidina al 0,12 % . Nistatina . H ₂ O destilada . DMSO (dimetilsulfóxido)
Efecto antimicrobiano y antifúngico (variable dependiente)	Tamaño del halo de inhibición formado alrededor del disco	Cuantitativa continua	Razón	mm

III. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y nivel de investigación

La presente investigación fue de tipo analítico, experimental *in vitro* de corte transversal.

3.2. Población y muestra

Población

Placas agar con cepas de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*.

Muestra

- Se realizó una prueba piloto en la que se aplicó la siguiente fórmula para hallar el tamaño muestral (comparación de medias):

$$N = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{d^2}$$

Donde

N = elementos necesarios en cada una de las muestras.

Z α = Valor Z correspondiente al riesgo deseado.

Z β = Valor Z correspondiente al riesgo deseado.

S = desviación típica.

D = diferencia de las dos medias valores de las medias.

Reemplazando, se obtuvo el siguiente resultado:

$$N = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{d^2}$$

$$N = \frac{2(1,96 + 0,84)^2 (0,3785937)^2}{(0,8333)^2}$$

$$N = 7,12364755$$

En conclusión, los elementos necesarios para realizar la presente investigación, fueron ocho placas para cada muestra.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Método: observación estructural.

Instrumentos:

- Calibrador.
- Ficha de recolección de datos (anexo 1).

Obtención y procesamiento de las muestras vegetales

El aceite esencial de las tres muestras vegetales se solicitó al Centro de Investigación de Plantas Medicinales Aromáticas y Medicina Tradicional (CIPLAMT) (anexo 2) y fue entregado por uno de sus investigadores, el doctor Mario Carhuapoma Yance.

El investigador refirió que para la toma de las muestras vegetales de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) se tomaron en cuenta las hojas de estas plantas, las cuales se encontraban a principios de su floración. Dicha recolección se dio en las vertientes naturales de una población vegetal, ubicadas a orillas de un

arroyo de la comunidad de Tranca (3300 msnm), distrito de Vinchos, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, durante el mes de diciembre de 2011. En los ambientes del CIPLAMT, las hojas de las tres muestras vegetales se desecaron bajo sombra a temperatura ambiente (21 °C), a una presión de 0,72 atmósferas, hasta obtener las muestras secas, que fueron conservadas en bolsas de papel kraft hasta su respectiva utilización. Este suceso se dio durante siete días en la ciudad de Huamanga.

La obtención del aceite esencial se dio a partir de 10 kg de hojas secas, las cuales fueron sometidas a destilación por el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de acero inoxidable, facilitado por el CIPLAMT. El destilado se separó, tomando en cuenta las propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de decantación de vidrio. Seguidamente, se deshidrataron las impurezas de agua en el aceite esencial con Na₂SO₄, sulfato de sodio anhidro. Luego se filtró, lográndose obtener 1,80 % v/p. Posteriormente, el aceite esencial obtenido de las tres muestras vegetales fue guardado en frascos de vidrios herméticos, color ámbar, bajo refrigeración, a una temperatura de 4 °C.

Análisis microbiológico

El método que se aplicó para el análisis de la actividad antibacteriana y antifúngica fue el método por difusión en agar, empleando discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, los cuales estuvieron impregnados con las siguientes sustancias: aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y al 100 %, y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 90 %. Con el fin de evaluar su efecto antifúngico, en el caso de las concentraciones al 50 %, se realizó una dilución 1:1 (aceite esencial + DMSO y agua destilada).

Como controles positivos se utilizó gluconato de clorexidina al 0,12 % (para bacterias) y nistatina (para hongos); y como controles negativos, H₂O destilada y DMSO, dimetilsulfóxido (anexo 3).

Ensayo con bacterias

Cepas bacterianas para el estudio

Se trabajó con cepas estándar ATCC (American Type Culture Collection) de dos especies bacterianas implicadas en la caries dental:

- *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746.

Para la reconstitución, estandarización, identificación, inoculación, aplicación de discos, incubación y toma de datos de la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se siguieron los siguientes pasos (anexo 4):

Reconstitución de las cepas estándar *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Para viabilizar esta cepa bacteriana se utilizó un frasco conteniendo infusión de cerebro-corazón (BHI) OXOID CM0225. Luego se incubó a 37 °C por 48 horas. Al cabo de ellas, se realizó un repicaje con este inóculo en una placa con agar cerebro-corazón (BHA) OXOID CM0375 y se incubó por 24 horas.

Estandarización del inóculo de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

La estandarización del inóculo fue según escala de McFarland 0.5, para lo cual se tomó con un asa estéril de tres a cuatro colonias de *Streptococcus mutans*, que se transfirieron a un tubo con 4 o 5 ml de solución salina estéril, controlando la turbidez del inóculo hasta obtener la misma turbidez que el patrón de McFarland 0.5., que equivale aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UCF/mL.

Identificación bacteriana de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Para lograr la identificación bacteriana se realizó un frotis bacteriano, que consistió en colocar una gota de agua estéril en el centro de un portaobjetos; luego se flameó el asa de siembra y se tomó en condiciones asépticas una pequeña cantidad del cultivo bacteriano, que se transfirió a la gota de agua. Se removi6 la mezcla con el asa de siembra hasta formar una extensión homogénea. Se dejó secar la preparación, se fijó a calor suave y en seguida se dio la coloración Gram para la identificación bacteriana. Realizado el frotis y fijadas las bacterias, se realizó el examen microscópico, determinando así la forma y el Gram de la cepa bacteriana de *Streptococcus mutans*.

Inoculación de las placas

Después de ajustar la turbidez de la suspensión del in6culo, se tom6 un hisopo seco y estéril y se procedió a sembrar el in6culo bacteriano de *Streptococcus mutans* en toda la superficie de las placas Petri de 90x150 mm, que contenían el medio BHA (anexo 5), siguiendo cuatro direcciones diferentes para conseguir una buena inoculación bacteriana. Posteriormente, se dejó reposar durante 15 minutos.

Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Se esterilizaron discos de 6 mm de diámetro y, con pinzas estériles, se procedió a colocar en cada una de las placas con BHA los siguientes discos: un disco con 10 ul de clorhexidina al 0,12 %, un disco con 10 ul de agua destilada, dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Mentha piperita* en las concentraciones de 50 y 100 %, dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) en las concentraciones de 50 y 100 %, y dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) en las concentraciones de 50 y 100 %. Los discos fueron embebidos con las respectivas sustancias con la ayuda de una micropipeta.

Incubación

Después de la colocación de los discos, las placas se dejaron reposar por 15 minutos para que las sustancias se disiparan en el medio. Luego, fueron colocadas en microaerofilia (jarra de anaerobiosis más una vela encendida) y llevadas a incubar a 37 °C por un período de 48 horas.

Toma de datos

Después de las 48 horas de incubación, cada placa fue examinada y se procedió a la lectura de los diámetros de los halos de inhibición, los cuales fueron medidos con la ayuda de un calibrador manual (Vernier), el cual dio la medida individual de los halos en milímetros, formados en cada uno de los discos embebidos con cada una de las sustancias presentes en las placas sembradas.

Ensayo con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746

Para la reconstitución, estandarización, identificación, inoculación, aplicación de discos, incubación y toma de datos de la cepa bacteriana *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746, se siguieron los siguientes pasos (anexo 4):

Reconstitución de las cepas estándar *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746

Para viabilizar esta cepa bacteriana se utilizó un frasco con caldo DIFCO Lactobacilli MRS 288130. Luego se llevó a la incubadora a 37 °C por 24 horas. Al cabo de ellas se realizó un repicaje con este inóculo en una placa con agar Difco Lactobacilli MRS 28821 y fue incubado por 24 horas.

Estandarización del inóculo *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746

La estandarización del inóculo se realizó según escala de McFarland 0.5, para lo cual se tomó con un asa estéril de una a cuatro colonias de *Lactobacillus acidophilus*, que se transfirieron a un tubo con 4 o 5 ml de solución salina estéril, controlando la turbidez del inóculo, hasta obtener la misma turbidez que el patrón de McFarland 0.5, que equivale aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UCF/mL.

Identificación bacteriana de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746

Para lograr la identificación bacteriana se realizó un frotis bacteriano, que consistió en colocar una gota de agua estéril en el centro de un portaobjetos, luego se flameó el asa de siembra y se tomó en condiciones asépticas una pequeña cantidad del cultivo bacteriano, que se transfirió a la gota de agua. Se removió la mezcla con el asa de siembra hasta formar una extensión homogénea. Se dejó secar la preparación, se fijó al calor suave y en seguida se dio la coloración Gram para la identificación bacteriana. Realizado el frotis y fijadas las bacterias, se realizó el examen microscópico determinando así la forma y el Gram de la cepa bacteriana de *Lactobacillus acidophilus*.

Inoculación de las placas

Después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se tomó un hisopo seco y estéril y se procedió a sembrar el inóculo bacteriano de *Lactobacillus acidophilus* en la superficie de las placas Petri de 90x150 mm que contienen agar MRS (anexo 5), donde se siguió cuatro direcciones diferentes, para así conseguir una buena dispersión del inóculo bacteriano. Posteriormente, se dejó reposar durante 15 minutos.

Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Se esterilizaron discos de 6 mm de diámetro y, con pinzas estériles, se

procedió a colocar, en cada una de las placas que contienen agar MRS, los siguientes discos: un disco con 10 ul de clorhexidina al 0,12 %, un disco con 10 ul de agua destilada, dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Mentha piperita* en las concentraciones de 50 y 100 %, dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Origanum vulgare* en las concentraciones de 50 y 100 %, y dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* en las concentraciones de 50 y 100 %. Los discos fueron embebidos con las respectivas sustancias con la ayuda de una micropipeta.

Incubación

Después de la colocación de los discos, las placas se dejaron reposar por 15 minutos para que las sustancias se absorban en el medio. Luego, las placas fueron colocadas en una jarra de anaerobiosis con una vela encendida para producir un ambiente microaerófilo. Luego fueron llevadas a incubar a 37 °C por un período de 24 horas. Este procedimiento se repitió seis veces.

Toma de datos

Después de las 24 horas de incubación, cada placa fue examinada y se procedió a la lectura de los diámetros de los halos de inhibición, los cuales fueron medidos con la ayuda de un calibrador manual (Vernier), que dio la medida individual de los halos en milímetros, formados en cada uno de los discos embebidos con cada una de las sustancias presentes en las placas sembradas.

Ensayo con hongos

Cepas fúngicas para el estudio

Se trabajó con la cepa estándar ATCC (American Type Culture Collection) de una especie bacteriana implicada en la candidiasis bucal, *Candida albicans* ATCC 90028.

Para la reconstitución, estandarización, identificación, inoculación, aplicación de discos, incubación y toma de datos de la cepa *Candida albicans* ATCC 90028, se siguieron los siguientes pasos (anexo 4):

Reconstitución de las cepas estándar *Candida albicans* ATCC 90028

Para viabilizar esta cepa fúngica se utilizó un frasco conteniendo infusión de cerebro-corazón (BHI) OXOID CM0225. Luego, se incubó a 37 °C por el lapso de 24 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó un repicaje con este inóculo en una placa con agar dextrosa de Sabouraud OXOID CM0041 y fue incubado por 24 horas.

Estandarización de *Candida albicans* ATCC 90028

La estandarización del inóculo fue según escala de McFarland 0.5, para lo cual se tomó con un asa estéril una o cuatro colonias de *Lactobacillus acidophilus* y se transfirieron a un tubo con 4 o 5 ml de solución salina estéril, controlando la turbidez del inóculo, hasta obtener la misma turbidez que el patrón de McFarland 0.5, que equivale aproximadamente a $1-2 \times 10^8$ UCF/mL.

Identificación fúngica de *Candida albicans* ATCC 90028

Para lograr la identificación fúngica se realizó un frotis bacteriano, que consistió en colocar una gota de agua estéril en el centro de un portaobjetos; luego se flameó el asa de siembra y se tomó en condiciones asépticas

una pequeña cantidad del cultivo bacteriano, que fue transferido a la gota de agua. Se removió la mezcla con el asa de siembra hasta formar una extensión homogénea. Se dejó secar la preparación, se fijó al calor suave y en seguida se dio la coloración Gram para la identificación fúngica. Realizado el frotis y fijada la levadura, se realizó el examen microscópico, determinando así la forma y el Gram de la cepa fúngica de *Candida albicans*.

Inoculación de las placas

Después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se tomó un hisopo seco y estéril y se procedió a sembrar el inóculo fúngico de *Candida albicans* en la superficie de las placas Petri de 90x150 mm que contenían el medio Agar Mueller Hinton (anexo 5), donde se siguió cuatro direcciones diferentes, para así conseguir una buena inoculación fúngica. Posteriormente, se dejó reposar durante 15 minutos.

Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Se esterilizaron discos de 6 mm de diámetro y, con pinzas estériles, se procedieron a colocar en cada una de las placas que contenían Agar Mueller Hinton: un disco con 10 ul de nistatina, un disco con 10 ul de DMSO, dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Mentha piperita* en las concentraciones de 50 y 100 %, dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Origanum vulgare* en las concentraciones de 50 y 100 %, y dos discos con 10 ul de aceite esencial de *Cymbopogon citratus* en las concentraciones de 50 y 90 %. Los discos fueron embebidos con las respectivas sustancias con la ayuda de una micropipeta.

Incubación

Después de la colocación de los discos, las placas se dejaron reposar por 15 minutos para que las sustancias se disiparan en el medio. Luego, fueron llevadas a incubar a 37 °C por un período de 24 horas. Este

procedimiento se llevó a cabo seis veces.

Toma de datos

Después de las 48 horas de incubación, cada placa fue examinada y se procedió a la lectura de los diámetros de los halos de inhibición, los cuales fueron medidos con la ayuda de un calibrador manual (Vernier), que dio la medida individual de los halos milímetros, formados en cada uno de los discos embebidos con cada una de las sustancias presentes en las placas sembradas.

3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico univariado, bivariado y multivariado en el programa SPSS 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

Análisis univariado

De las variables cuantitativas se obtuvieron las medidas de tendencia central (media, moda y mediana), y las medidas de dispersión (desviación estándar y varianza).

Análisis bivariado

Se realizó el análisis de la relación entre variables; si presentaran distribución normal, se utilizará la prueba t-student; y si no tuviese distribución normal, se utilizará la prueba de U Mann-Whitney.

Análisis multivariado

Se realizará el análisis de la relación entre variables; si presentaran distribución normal, se utilizará la prueba Anova; y si no tuviesen distribución normal, se utilizará la prueba de kruskal-Wallis.

3.5. Aspectos éticos

- Carta de presentación por la Escuela de Odontología de la Universidad Norbert Wiener (anexo 6).
- Carta de aprobación por la Escuela de Odontología de la Universidad Norbert Wiener (anexo 7).
- Carta de presentación dirigida al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Cayetano Heredia (anexo 8).
- Constancia de haber trabajado en el Laboratorio de la Universidad Cayetano Heredia (anexo 9).
- El desecho de las muestras en el presente estudio se basó en las normas dadas por el International Ethical Guidelines for Biomedical Research involving Humans Subjects (CIOMS).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Tabla 1. Determinación de los halos inhibitorios de las sustancias experimentales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

$p < 0,001$

Sustancias experimentales	N	Media (mm)	Mediana (mm)	Varianza	Desv. Stand.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
Orégano 100 %	8	25,72	26,00	3,97	1,99	22,1	28,6
Orégano 50 %	8	8,53	8,60	1,22	1,10	7	9,8
Menta 100 %	8	11,65	11,70	0,95	0,97	10	13,4
Hierba luisa 100 %	8	22,27	23,70	13,47	3,67	17,1	26,6
Hierba luisa 50 %	8	8,36	8,20	2,64	1,62	6,5	11,3
Clorhexidina	8	14,26	14,30	0,01	0,10	14	14,3

Kruskall Wallis.

El presente estudio se basó en la evaluación del efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028, comparados con la clorhexidina al 0,12 % y con la nistatina. La actividad antibacteriana de las sustancias experimentales frente a la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se presentó de la siguiente manera. El aceite esencial de orégano al 100 % tuvo un promedio en los halos de inhibición de $25,72 \pm 1,99$ mm; el aceite esencial de orégano al 50 % de $8,53 \pm 1,10$ mm; el aceite esencial de menta al 100 % de $11,65 \pm 0,97$ mm; el aceite esencial de hierba luisa al 100 % de $22,27 \pm 3,67$ mm; el aceite esencial de hierba luisa al 50 % de $8,36 \pm 1,62$ mm; y con clorhexidina al 0,12 % de $14,26 \pm 0,10$ mm. No se considera en la tabla el aceite esencial de menta al 50 %, ya que dicho aceite presentó un promedio de 0 de halo de inhibición frente a *Streptococcus mutans* (tabla 1, anexo 10).

Tabla 2. Comparación de los halos inhibitorios de las sustancias experimentales frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Sustancias experimentales		Valor de p
Orégano 100%	Orégano 50 %	< 0,001 (*)
	Menta 100 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 100 %	0,034 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (*)
Orégano 50%	Menta 100 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	0,805 (*)
Menta 100%	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (*)
Hierba luisa 100%	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (*)

(*) Prueba T de student.

(**) U Mann-Whitney.

Al comparar los halos de inhibición de las sustancias experimentales en ambas concentraciones al 50% y al 100 % frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se observó que tienen diferencias estadísticamente significativas, con un $p < 0,001$; no obstante, para el caso de orégano al 100 %, comparado con hierba luisa al 100 %, también presentó diferencia significativa, pero con un $p = 0,034$. Sin embargo, para el caso de orégano al 50 %, comparado con hierba luisa al 50 %, no se vio diferencias estadísticamente significativas, ya que presentó un $p = 0,805$ (tabla 2).

Tabla 3. Determinación de los halos inhibitorios de las sustancias experimentales frente a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746

$p < 0,001$

Sustancias experimentales	N	Media (mm)	Mediana (mm)	Varianza	Desv. Stand.	Mínimo (mm)	Máximo (mm)
	8	15,31	15,3	0,16	0,40	14,8	15,8
Orégano 100 %	8	11,7	11,8	0,14	0,38	11	12,1
Orégano 50 %	8	12,6	12,5	0,22	0,46	12,1	13,2
Menta 100 %	8	20,15	20,15	0,04	0,20	19,8	20,5
Hierba luisa 100 %	8	13,83	13,95	0,16	0,41	13	14,2
Hierba luisa 50 %	8	13,23	13,25	0,01	0,10	13,1	13,4
Clorhexidina	8						

Kruskall Wallis.

La actividad antibacteriana de las sustancias experimentales frente a la cepa *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 se presentó de la siguiente manera: el aceite esencial de orégano al 100% tuvo un promedio en los halos de inhibición de $15,31 \pm 0,40$ mm; el aceite esencial de orégano al 50 %, de $11,7 \pm 0,38$ mm; el aceite esencial de menta al 100 %, de $12,06 \pm 0,46$ mm; el aceite esencial de hierba luisa al 100 %, de $20,15 \pm 0,20$ mm; el aceite esencial de hierba luisa al 50 %, de $13,83 \pm 0,41$ mm; y con clorhexidina al 0,12 %, de $13,23 \pm 0,10$ mm. No se ha considerado en la tabla el aceite esencial de menta al 50 %, ya que presentó un promedio de 0 de halo de inhibición frente a *Lactobacillus acidophilus* (tabla 3, anexo 10).

Tabla 4. Comparación de los halos inhibitorios de las sustancias experimentales frente a *Lactobacillus acidophilus*

Sustancias experimentales		Valor de p
Orégano 100 %	Orégano 50 %	< 0,001 (*)
	Menta 100 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (*)
Orégano 50 %	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (*)
	Menta 100 %	< 0,001 (*)
Menta 100 %	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (*)
Hierba luisa 100 %	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (*)

(*) Prueba T de student.

(**) U Mann-Whitney.

Al comparar las concentraciones al 100 % del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon Citratus* (hierba luisa), se observó que tienen diferencias estadísticamente significativa con un $p < 0,001$ (tabla 4) con respecto de las concentraciones de 50 % frente a la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746.

Tabla 5. Determinación de los halos inhibitorios de las sustancias experimentales frente a *Candida albicans* ATCC 90028

$p < 0,001$

Sustancias		Media	Mediana		Desv.	Mínimo	Máximo
experimentales	n	(mm)	(mm)	Varianza	Stand.	(mm)	(mm)
Orégano 100 %	8	56,25	56,10	11,54	3,40	50,00	62,00
Orégano 50 %	8	23,67	23,85	3,76	1,94	21,50	26,20
Menta 100 %	8	39,46	39,50	0,17	0,42	38,50	39,80
Menta 50 %	8	12,82	12,70	0,44	0,66	12,20	13,90
Hierba luisa 90 %	8	76,15	76,30	0,18	0,42	75,60	76,60
Hierba luisa 50 %	8	19,59	19,65	0,08	0,29	18,90	19,80
Nistatina	8	13,21	13,70	0,96	0,98	11,90	14,10

Kruskall Wallis.

La actividad antifúngica de las sustancias experimentales frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 90028 se presentó de la siguiente manera: el aceite esencial de orégano al 100 % tuvo un promedio en los halos de inhibición de $56,25 \pm 3,40$ mm; el aceite esencial de orégano al 50 %, de $23,67 \pm 1,94$ mm; el aceite esencial de menta al 100 %, de $39,46 \pm 0,42$ mm; el aceite esencial de menta al 50 %, de $12,82 \pm 0,66$ mm; el aceite esencial de hierba luisa al 90 %, de $76,15 \pm 0,4$ 2 mm; el aceite esencial de hierba luisa al 50 %, de $19,59 \pm 0,29$ mm; y con nistatina, de $13,21 \pm 0,98$ mm (tabla 5, anexo 10).

Tabla 6. Comparación de los halos inhibitorios de las sustancias experimentales frente a *Candida albicans* ATCC 90028

Sustancias experimentales		Valor de p
Orégano 100 %	Orégano 50 %	< 0,001 (*)
	Menta 100 %	< 0,001 (**)
	Menta 50 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 90 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)
Orégano 50 %	Menta 100 %	< 0,001 (**)
	Menta 50 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 90 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)
Menta 100 %	Menta 50 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 90 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)
Menta 50 %	Hierba luisa 90 %	< 0,001 (*)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)
Hierba luisa 90 %	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)

(*) Prueba T de student.

(**) U Mann-Whitney.

Al comparar las concentraciones al 100 % del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano), y al 90 % de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), se observó que tienen diferencias estadísticamente significativa con un $p < 0,001$ (tabla 6), con respecto de las concentraciones de 50 % frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 90028.

Tabla 7. Efecto antibacteriano de menta, orégano y hierba luisa al 50 y 100 %, comparado con clorhexidina al 0,12 % frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746

Sustancias experimentales	<i>Streptococcus mutans</i> Valor p	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Valor p
Clorhexidina 0,12 %	Orégano 100 %	< 0,001 (**)
	Orégano 50 %	< 0,001 (**)
	Menta 100 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)

(*) Prueba T de student.

(**) U Mann-Whitney.

Cuando se realizaron las comparaciones del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 100 % con clorhexidina al 0,12 %, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se encontró que tienen diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,001$ (tabla 7). No obstante, no se ha considerado en la tabla el aceite esencial de menta al 50 %, ya que presentó un promedio de 0 de halo de inhibición frente a *Streptococcus mutans* (tabla 7).

Cuando se realizó las comparaciones del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 100 % con clorhexidina al 0,12 %, frente a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746, se encontró que tienen diferencia estadísticamente significativa $p < 0,001$. Pero, para el caso de clorhexidina comparada con menta al 100 %, presentó un $p = 0,006$. Igualmente, en el caso de clorhexidina comparada con hierba luisa al 50 %, presentó un $p = 0,0113$ (tabla 7).

Tabla 8. Efecto Antifúngico de menta y orégano al 50 y al 100 %; y hierba luisa al 50 y al 90 %, comparadas con nistatina frente a *Candida Albicans* ATCC 90028

Sustancias experimentales	Valor de p	
Nistatina	orégano 100 %	< 0,001 (*)
	orégano 50 %	< 0,001 (*)
	menta 100 %	< 0,001 (**)
	menta 50 %	0,3701 (*)
	hierba luisa 90 %	< 0,001 (*)
	hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)

(*) Prueba T de student.

(**) U Mann-Whitney.

Al realizar las comparaciones del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano) al 50 y al 100 %, y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 90 %, con nistatina frente a *Candida albicans* ATCC 90028, se encontró que tienen diferencia estadísticamente significativa con un $p < 0,001$ (tabla 8), excepto para el caso de nistatina con menta al 50 %, ya que no se vio diferencias estadísticamente significativas $p = 0,3701$ (tabla 8, anexo 10).

Tabla 9. Efecto antibacteriano de menta, orégano y hierba luisa al 50 y al 100 % comparadas con DMSO y H2O frente a *Streptococcus Mutans* ATCC 25175 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746

Sustancias experimentales	<i>Streptococcus mutans</i> Valor p	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Valor p
DMSO	Orégano 100%	< 0,001 (**)
	Orégano 50%	< 0,001 (**)
	Menta 100 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 100%	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 50%	< 0,001 (**)
Agua destilada	Orégano 100%	< 0,001 (**)
	Orégano 50%	< 0,001 (**)
	Menta 100 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 100%	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 50%	< 0,001 (**)

(**) U Mann-Whitney.

Cuando se evaluó el efecto antibacteriano de las tres sustancias experimentales, comparándolas con DMSO (dimetilsulfóxido) y agua destilada frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746, se encontró que tienen diferencia estadísticamente significativa $p < 0,001$, ya que son sustancias consideradas como controles negativos (tabla 9, anexo 10).

Tabla 10. Efecto antifúngico de menta y orégano al 50 y al 100 %, y de hierba luisa al 50 y al 90 %, comparado con DMSO y H2O frente a *Candida albicans* ATCC 90028

	Sustancias experimentales	Valor de p
DMSO	Orégano 100%	< 0,001 (**)
	Orégano 50 %	< 0,001 (**)
	Menta 100 %	< 0,001 (**)
	Menta 50 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)
Agua destilada	Orégano 100%	< 0,001 (**)
	Orégano 50 %	< 0,001 (**)
	Menta 100 %	0,001 (**)
	Menta 50 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 100 %	< 0,001 (**)
	Hierba luisa 50 %	< 0,001 (**)

(**) U Mann-Whitney.

Cuando se evaluó el efecto antifúngico de las tres sustancias experimentales comparándolas con DMSO (dimetilsulfóxido) y agua destilada frente a *Candida albicans* ATCC 90028, se encontró que tienen diferencia estadísticamente significativa $p < 0,001$, ya que son sustancias consideradas como controles negativos (tabla 10, anexo 10).

4.2. Discusión

En la presente investigación de tipo experimental *in vitro* se buscó determinar el efecto antibacteriano de la *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 % y al 100 %, comparado con el efecto antibacteriano de la clorhexidina al 0,12 %, frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746. Igualmente, se buscó determinar el efecto antifúngico de *Mentha piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano) al 50 % y al 100 %, y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 50 y al 90 %, comparados con el efecto antifúngico de la nistatina frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 90028. En cuanto al aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), se disminuyó su concentración al 90 % frente a *Candida albicans*, ya que dicha sustancia al 100 % inhibía completamente a la cepa fúngica, sin poder medir el halo de inhibición en las respectivas placas Petri. Es por ello que se determinó bajar la concentración para evaluar su efecto antifúngico.

El tamaño de la muestra para cada sustancia experimental fue obtenido realizando previamente una prueba piloto, en la que se aplicó una fórmula de comparación de medias, donde el resultado fue ocho placas Petri para la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, ocho placas Petri para la cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y ocho placas Petri para las cepa de *Candida albicans* ATCC 90028. Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados por varios investigadores, a continuación se explican dichos estudios:

El orégano del género *Origanum* presenta, dentro de sus compuestos químicos, grupos fenólicos, los cuales han sido estudiados y evaluados frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos, demostrando un alto poder antibacteriano y antifúngico, debido a la presencia del timol y carvacrol^{10,12,15}.

En otro estudio se evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *O. vulgare*. En él se comprobó su efecto antibacteriano frente a bacterias Gram positivas, como *Streptococcus* y *Corynebacterium*, y frente a bacterias Gram negativas, como *Staphylococcus*. En el presente estudio, la efectividad

antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de orégano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028 quedó demostrada, ya que se generó halos de inhibición al ser expuestas las cepas frente a dicho aceite esencial, el cual presentó compuestos fenólicos, como carvacrol y timol, los cuales le dan mayor actividad contra los tres tipos de microorganismos patógenos¹⁹.

En el presente estudio, se demostró que el aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) al 50 % no mostró efecto antibacteriano, a diferencia del estudio realizado por De la Paz J y col., quienes comprobaron que la decocción de las hojas de *Mentha piperita* Linn (menta) sí posee efecto antiparasitario¹⁴.

En un estudio presentado por Rojas y col., ellos evaluaron la actividad anti *Trypanosoma cruzi in vitro* de los aceites esenciales de diez plantas medicinales, entre ellas *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Mentha X piperita* L (menta), concluyendo que el aceite esencial de hierba luisa mostró actividad anti *Trypanosoma cruzi*; sin embargo, para el caso de la menta, no inhibió el crecimiento de *T. cruzi*. En concordancia con el presente estudio, el aceite esencial de hierba luisa también presentó efecto antibacteriano y antifúngico sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028, pero en el caso de la *Mentha piperita* (menta), no presentó efecto antibacteriano, aunque sí antifúngico¹¹.

En el presente estudio, el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) en su dilución al 90 %, enfrentado a *Candida albicans*, presentó halos de inhibición de mayor diámetro en comparación con otras cepas ATCC; esto coincide con el estudio de Alzamora y col., que concluyeron que el aceite esencial de hierba luisa fue el que ejerció mayor efecto sobre los microorganismos evaluados, entre ellos, la cepa *Candida albicans*⁸.

Borja demostró que el aceite esencial del *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) es un buen agente antibacteriano frente al *Streptococcus mutans*, y su acción es más efectiva que el control positivo (clorhexidina al 0,12 %). En concordancia con el presente estudio, en el que se demostró el efecto

antibacteriano del aceite esencial al 50 y al 100 % sobre *Streptococcus mutans*, pero con la diferencia de que, al compararlo con la clorhexidina, su acción fue menos efectiva al 50 %, pero mucho más efectiva al 100 %¹³.

En la comparación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los tres aceites esenciales, *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) presentó, en ambas concentraciones, los mejores resultados sobre *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028. Esta acción se le atribuye al citral, particularmente por la presencia de alcoholes como linalol, nerol y geraniol, dado que esta es una reconocida sustancia con propiedades antibacterianas y antiparasitarias^{11,16,18,41}.

Los diversos tipos de aceites esenciales mencionados tienen efectividad antibacteriana y antifúngica, ya que dentro de su composición presentan grupos fenólicos, alcoholes o cetonas. Entre los más representativos se encuentra compuestos fenólicos como el timol y el carvacrol; alcoholes, como linalol; y compuestos, como mentona^{10,37,41}.

Los aceites esenciales de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) mostraron ser más efectivos al 100 % al compararlos con los de 50 % frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028 ($p < 0,001$). Esto se debe a que el aceite esencial de las mencionadas plantas al 100 % son concentraciones que no fueron sometidas a un proceso de dilución, como fue en el caso que se dio en los aceites esenciales en las concentraciones al 50 %. Para obtener dicha concentración al 50 % se diluyeron como vehículos el DMSO (dimetilsulfóxido) y el agua destilada; por ello se explica la disminución del efecto antibacteriano y antifúngico, ya que presentan menos concentración de los compuestos químicos presentes en estos aceites esenciales. Es importante resaltar que, al ser sometidos estos aceites esenciales a menores concentraciones, serán menos efectivos o no presentarán halos de inhibición, como en el caso del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), que presentó un halo de inhibición de 0 mm frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.

Para la presente investigación se utilizó como control negativo DMSO

(dimetilsulfóxido) y agua destilada, los cuales no formaron halos inhibitorios en ninguno de los ensayos, manteniéndose como constante de 0 mm. Asimismo, ambas sustancias fueron usadas para las disoluciones de los aceites esenciales, los cuales sirvieron a manera de control de calidad, garantizando la siembra bacteriana y que la formación de los halos inhibitorios alrededor de los discos embebidos con los aceites esenciales de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) fueran formados por estas sustancias.

Asimismo, los experimentos *in vitro* tienen sus limitaciones en cuanto a la posible eficacia *in vivo*; los resultados de este estudio merecen atención respecto del efecto citotóxico de dichos aceites esenciales. Por lo tanto, se propone realizar futuras investigaciones para evaluar posibles efectos citotóxicos del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y, a la vez, se sugiere hallar una concentración mínima inhibitoria ideal para cada aceite esencial estudiado.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de tres aceites esenciales, los cuales demostraron su efecto en el siguiente orden: *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), *Origanum vulgare* (orégano) y *Mentha piperita* (menta), los que representan una buena alternativa para evitar el uso de productos sintéticos en el control de los tres patógenos ensayados.
- De los tres aceites esenciales al 50 % (8,53 mm) y al 100 % (25,72 mm), el que tuvo mayor efecto sobre *Streptococcus mutans* fue el *Origanum vulgare* (orégano).
- El aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 90 % posee mayor actividad antifúngica que antibacteriana, ya que formó un halo inhibitorio de 76,15 mm sobre *Candida albicans* ATCC 90028.
- De la comparación entre los tres aceites esenciales, los resultados con mayores valores frente a *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans* fueron del aceite esencial de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), mientras que los menores valores se observaron con el aceite esencial de *Mentha piperita* (menta).
- A una concentración de 100 %, el aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) y de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) al 100 y al 90 % tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos clorhexidina al 0,12 % y nistatina, a excepción de la *Mentha piperita* (menta) al 50 %, que tuvo una acción menor que los controles positivos.
- El aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) al 50 % no formó halos de inhibición (0 mm) frente a *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.

5.2. Recomendaciones

- Realizar estudios de la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) frente a otras bacterias de interés odontológico.
- Realizar estudios sobre la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) en diferentes concentraciones de las realizadas por este estudio.
- Comparar la actividad antibacteriana y antifúngica del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) frente a diferentes fármacos utilizados en odontología.
- Se sugiere ampliar el trabajo, extendiéndolo a estudiar la posibilidad de acción sinérgica entre el aceite esencial de *Mentha piperita* (menta), *Origanum vulgare* (orégano), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), clorhexidina al 0,12 % y nistatina, así como con otros medicamentos anticariogénicos y antifúngicos de uso clínico, como colutorios bucales comerciales.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aricapa D. *Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos*. [Tesis doctoral]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2009.
2. Romero M, Hernández Y, Gil M. “Actividad inhibitoria de la *Matricaria recutita* ‘manzanilla alemana’ sobre el *Streptococcus mutans*. *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría*; 2009.
3. Pérez J, Duque de Estrada J, Hidalgo I. “Asociación del *Streptococcus mutans* y lactobacilos con la caries dental en niños”. *Revista Cubana de Estomatología*. 2007; 44(4): 0-0.
4. Rueda F, Hernández SE. “Prevalencia de *Candida albicans* aislada de la cavidad oral de pacientes con cáncer”. *Revista Odontológica Latinoamericana* 2008; 0(2): 38-41.
5. Pardi G, Guilarte C, Cardozo E. “Detección de *Candida albicans* en pacientes con candidiasis pseudomembranosa”. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*. 2008; 20(3): 228-36.
6. Eguizábal M, Moromi H. “Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Odontología Sanmarquina*. 2007; 10(2):18-20.
7. Céspedes J, Huamaní Y. “Efecto de la clorhexidina y la nistatina sobre el recuento de colonias aisladas de candidiasis en niños con VIH-sida. *Revista Odontológica Pediátrica*. 2006; 5(2): 3-6.
8. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. *Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas*. Anales de la Facultad de Medicina. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2001; 62 (2): 156-161.
9. Moromi H, Martínez E, Villavicencio J, Burga J, Ramos D. “Efecto antimicrobiano *in vitro* de la *Camellia sinensis* sobre bacterias orales. *Odontología Sanmarquina*. 2007; 10(1): 18-20.
10. Bastos M, Damé L, De Souza L, Almeida D, Alves M, Braga J. “Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Cuba. 2011; 16(3): 260-266.

11. Rojas J, Solís H, Palacios O. *Evaluación in vitro de la actividad anti Trypanosoma cruzi de aceites esenciales de diez plantas medicinales*. Anales de la Facultad de Medicina. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010; 71(3):161-165.
12. De Souza L, Frascolla R, Santin R, Ziemann M, Costa R, Alves M *et al*. “Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Cuba. 2008; 13(4): 0-0.
13. Borja F. *Actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del Cymbopogon citratus frente al Streptococcus mutans in vitro*. [Tesis para optar al título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Federico Villarreal; 2007.
14. De la Paz J, Maceira M, Corral A, González C. “Actividad antiparasitaria de una decocción de *Mentha piperita* Linn”. *Revista Cubana de Medicina Militar*. Cuba. 2006; 35(3): 1-4.
15. García C. *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus con resistencia múltiple*. [Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agropecuarias]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2006.
16. Guerra M, Rodríguez M, García G, Llerena C. “Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Cuba. 2004; 9(2): 1-6.
17. Bankole S, Joda A. “Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.) *African Journal of Biotechnology*. 2004; 3(1): 52-59.
18. Hernández L, Rodríguez M. “Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba”. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Cuba. 2001; 2: 44-47.
19. Albado E, Sáez G, Grabiell S. “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano)”.

- Revista Médica Herediana*. Perú: Universidad Peruana Cayetano Heredia. 2001; 12(1): 16-19.
20. Hammer K, Carson C. Riley T. “Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts”. *Journal of Applied Microbiology*. 1999; 86: 985-990.
21. Henostroza G. *Diagnóstico de caries dental*. 2.^a ed. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2005.
22. Medina R, Moreno L, Velasco M, Gutiérrez S. *Estudio comparativo de medios de cultivo para crecimiento y recuperación del Streptococcus mutans ATCC 25175 “in vitro”*. NOVA. 2005; 3(3): 25-30.
23. Sánchez V. *Evaluación del estado de salud bucodental y su relación con estilos de vidas saludables en la provincia de Salamanca*. [Tesis para optar al título de Doctor]. Salamanca: Universidad de Salamanca; 2008.
24. Vela I. *Efecto de la aplicación tópica de un enjuagatorio en base a xilitol, flúor y manzanilla (Ortodent) en un grupo de pacientes con síndrome de Down*. [Tesis para la obtención del título de Especialista en Odontopediatría]. Ecuador: Universidad San Francisco de Quito; 2007.
25. De Figueiredo L. *Odontología para el bebé*. Sao Paulo: Artes Médicas; 2000.
26. Cosco D. *Actividad inhibitoria del crecimiento de Streptococcus mutans y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la Matricaria chamomilla “manzanilla”*. [Tesis para optar al título de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.
27. Liébana J. *Microbiología Oral*. 2.^a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2002.
28. Gómez C. *Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de Myrciantes hallii (arrayán), Amaranthus asplundii (ataco), Peperomia peltigera (pataku yuyo), especies reportadas en Peguche-Imbarura, sobre Streptococcus mutans, klebsiella pneumoniae, Candida albicans causantes de enfermedades*

- bucofaríngeas*. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército. Sede Sangolquí; 2010.
29. Panreac Química. *Manual básico de microbiología*. 4.^a ed. Barcelona: Cultimed; 2003.
30. Pérez R, Carrasco M. *Crecimiento in vitro de Streptococcus mutans y Lactobacillus acidophilus en medios que contengan edulcorantes artificiales*. Kiru. 2006; 3(1): 1-6.
31. Sulca T, *Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de Acmella repens (botoncillo), Urtica dioica (Ortiga Negra) y Sonchus Oleraceus (Kana yuyo), plantas registradas en la parroquia La Esperanza-Imbabura, sobre Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans, causantes de enfermedades bucofaríngeas*. [Tesis para optar al título de Ingeniera en Biotecnología]. Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército; 2010.
32. Mendo M. *Medios de cultivo en microbiología*. 3.^a ed. Lima: Tricelm; 1989.
33. Montesdeoca V. *Elaboración y control de calidad de comprimidos fitofarmacéuticos de ajeno (Artemisia absinthium L.), romero (Rosmarinus officinalis L.) y manzanilla (Matricaria chamomilla L.) para combatir la menstruación dolorosa*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2010.
34. Cruz P. *Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (Matricaria Chamomilla), matico (Aristiguetia glutinosa) y marco (Ambrosia Arborescens) para neo-fármaco*. [Tesis de grado previa a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2009.
35. "Las plantas aromáticas, *menta* o *Mentha*". *Revista de la natura y ambiente*. [Revisado el 5 de mayo de 2012]. Disponible en http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/menta/
36. Tonguino M. *Determinación de las condiciones óptimas para la deshidratación de dos plantas aromáticas: menta (Mentha piperita L.) y orégano (Origanum vulgare L.)*. [Tesis previa a la obtención

- del título de Ingeniero Agroindustrial]. Ecuador: Universidad Técnica del Norte; 2011.
37. Fonnegra R, Jiménez L. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. 2.^a ed. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2007.
 38. “*Mentha piperita*”, *Revista de plantas Botánica*. [Revisado el 8 de mayo de 2012]. Disponible en <http://www.botanicalonline.com/medicinalsmentapiperita.htm>
 39. “Las plantas aromáticas, orégano”, *Revista de la natura y ambiente*. [Revisado el 5 de octubre de 2011]. Disponible en http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/oregano/
 40. Arcila C, Loarca G, Lecona S, González E. *El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes*. Alan. 2004; 54(1): 100-111.
 41. Del Pozo X. *Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de hierba luisa (Cymbopogon citratus (DC) stapf)*. [Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología]. Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército; 2006.
 42. Dellacassa E, Baldoni A. “Hierbaluisa *Aloysia citriodora* Palau”. *Revista de Fitoterapia*. 2003; 3(1): 19-25.
 43. González A. *Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas*. [Trabajo para optar al título de Ingeniera Química]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2004.
 44. Dorland. “Caries dental; etiología, placa bacteriana”. *Diccionario médico ilustrado*. 26.^a ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 2003; págs. 129, 307, 641.
 45. Mosby. “*Candida albicans*”. *Diccionario de odontología*. 2.^a ed. Barcelona: Elsevier. 2009; pág. 94.

VII. ANEXOS

Anexo 1

Tabla de recolección de datos para medir el tamaño de los halos de inhibición sobre *Streptococcus mutans*

PATÓGENO <i>Streptococcus mutans</i>	Concentración del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> "menta"		Concentración del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "orégano"		Concentración del aceite esencial <i>Cymbopogon citratus</i> "hierba luisa"	
	50 %	100 %	50 %	100 %	50 %	100 %
Muestra 1						
Muestra 2						
Muestra 3						
Muestra 4						
Muestra 5						
Muestra 6						
Muestra 7						
Muestra 8						

Tabla de recolección de datos para medir el tamaño de los halos de inhibición sobre *Lactobacillus acidophilus*

PATÓGENO <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Concentración del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> "menta"		Concentración del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "orégano"		Concentración del aceite esencial <i>Cymbopogon citratus</i> "hierba luisa"	
	50 %	100 %	50 %	100 %	50 %	100 %
Muestra 1						
Muestra 2						
Muestra 3						
Muestra 4						
Muestra 5						
Muestra 6						
Muestra 7						
Muestra 8						

Tabla de recolección de datos para medir el tamaño de los halos de inhibición sobre *Candida albicans*

PATÓGENO <i>Candida albicans</i>	Concentración del aceite esencial de <i>Mentha piperita</i> "menta"		Concentración del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "orégano"		Concentración del aceite esencial <i>Cymbopogon citratus</i> "hierba luisa"	
	50%	100 %	50 %	100 %	50 %	90 %
Muestra 1						
Muestra 2						
Muestra 3						
Muestra 4						
Muestra 5						
Muestra 6						
Muestra 7						
Muestra 8						

Anexo 2



**CENTRO DE INVESTIGACION DE PLANTAS MEDICINALES
AROMATICAS Y MEDICINA TRADICIONAL**
- AGROINDUSTRIAS WARI ANDINO -
CIPLAMT

CERTIFICADO

El Jefe Responsable del Laboratorio del CIPLAMT, CERTIFICA que los aceites esenciales de:

- 1.- *Origanum vulgare*, "orégano", cuyo marcador molecular es carvacrol.
- 2.- *Mentha piperit*, "menta", cuyo marcador molecular es mentol.
- 3.- *Cymbopogon citratus* "hierba luisa", cuyo marcador molecular es citral y citronelal.

Las tres especies fueron analizadas y extraídas sus aceites esenciales por el método de arrastre con vapor de agua a solicitud de la Srta. **Gisella Maravi**.

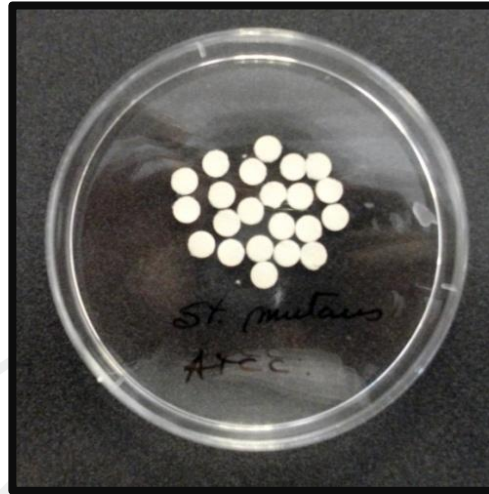
Se extiende el presente documento a solicitud del interesado, para los fines que estime conveniente.

Lima, 10 mayo del 2012.

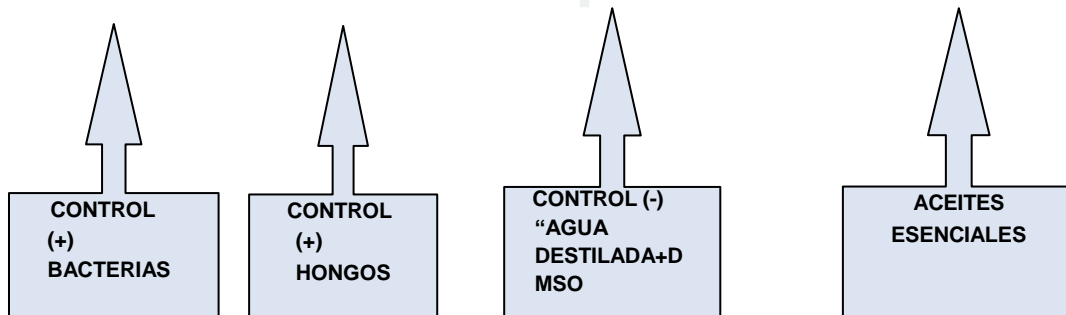

Dr. Mario Carhuapoma Yance
QUIMICO FARMACEUTICO
CQFP. 10215

Anexo 3

Discos de papel filtro de 6 mm



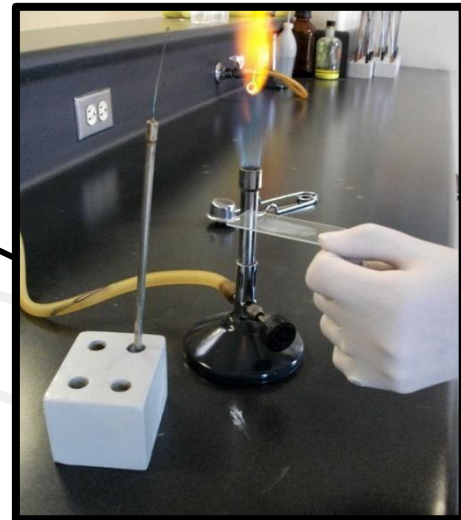
Sustancias experimentales



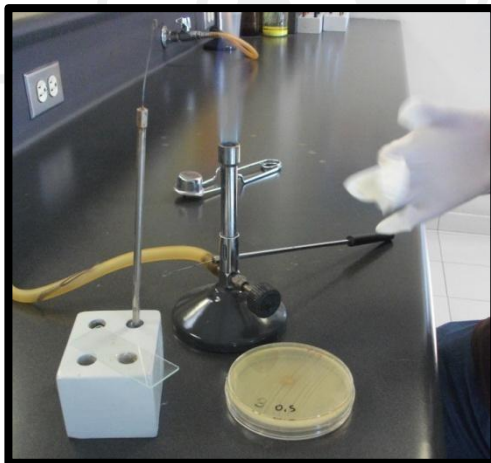
Anexo 4

Frotis bacteriano

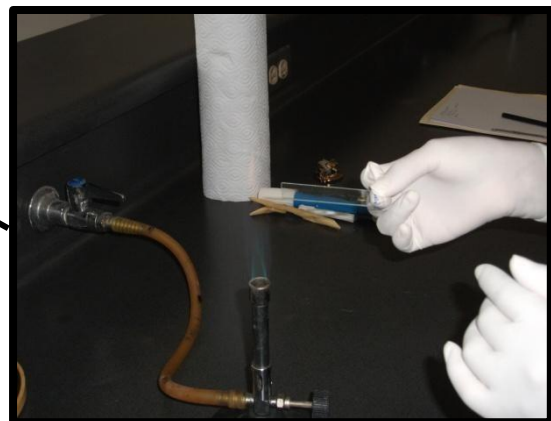
**APLICACIÓN DE UNA
GOTA DE AGUA ESTÉRIL**



**TOMA Y FROTIS DE
MUESTRA
BACTERIANA**



**SECAR Y FIJAR
LA
MUESTRA**

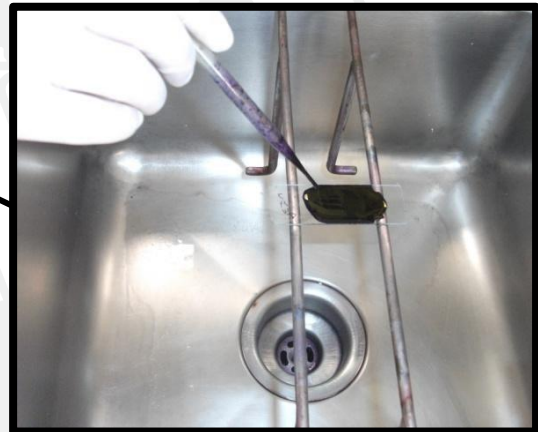


Coloración Gram

**COLORANTE
S
UTILIZADOS**



**1. AGREGAR
CRISTAL
VIOLETA**



**2.
AGREGA
R LUGOL**



Coloración Gram

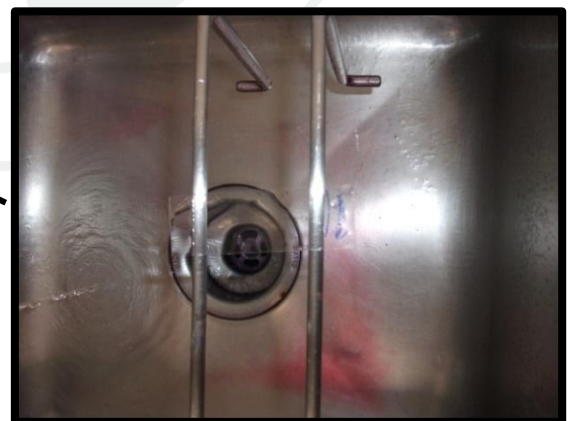
**3. ENJUAGAR CON
AGUA CORRIENTE**



**4. AGREGAR
ALCOHOL -
ACETONA**



**5. ENJUAGAR
CON AGUA
CORRIENTE**



Coloración Gram



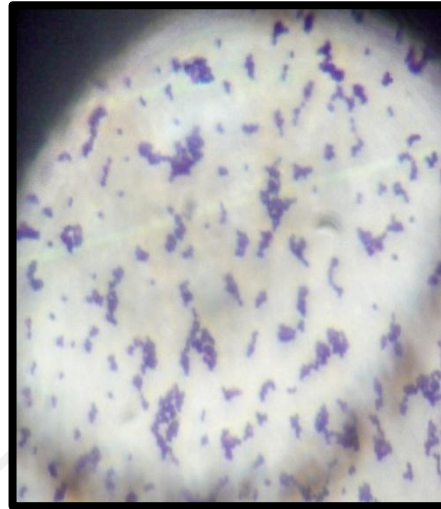
**6.
AGREGAR
SAFRANIN
A**

**7. ENJUAGAR CON
AGUA CORRIENTE**

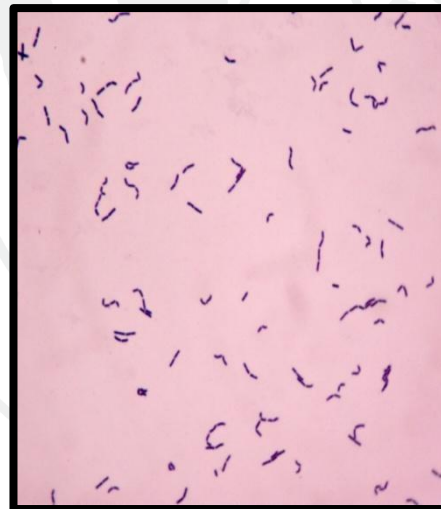


**8. DEJAR SECAR
Y OBSERVAR**

Observación al microscopio óptico: Cepa *Streptococcus mutans*

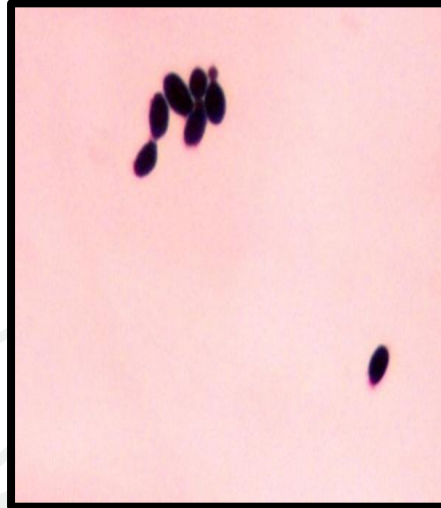


Observación al microscopio óptico: Cepa *Lactobacillus acidophilus*

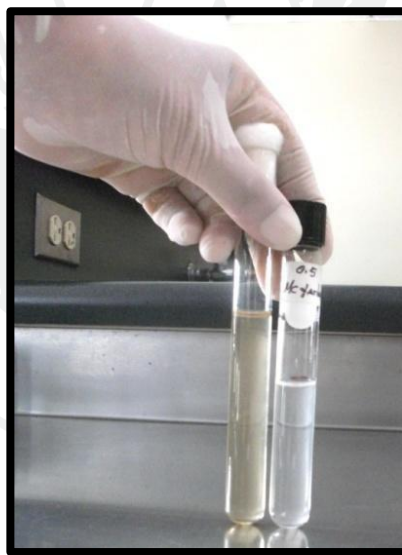


Observación al microscopio óptico:

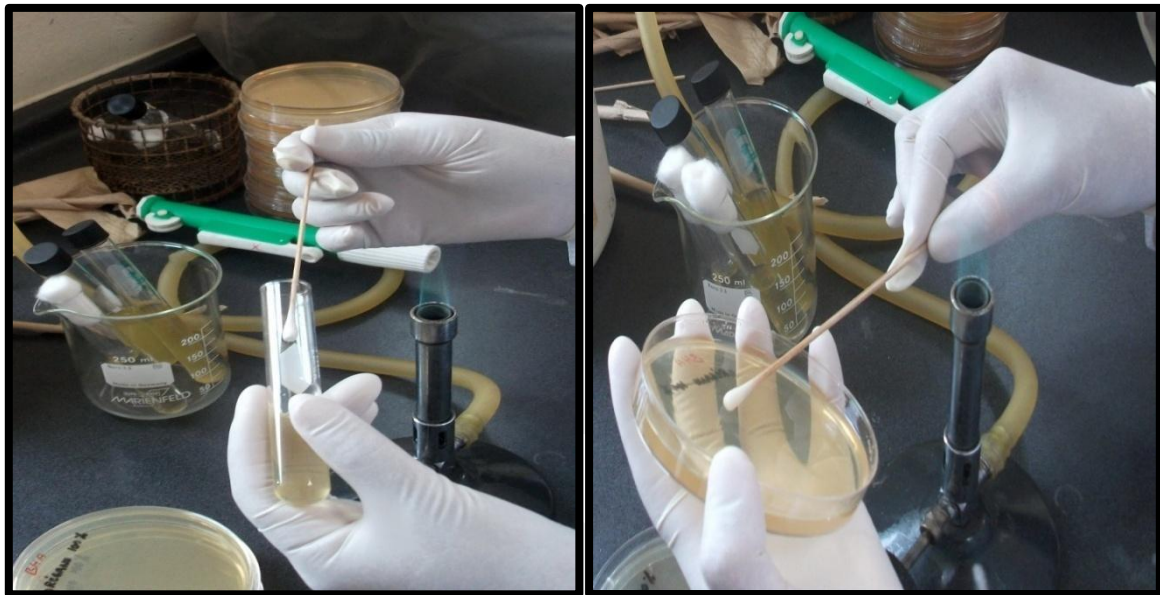
Cepa Candida albicans



Estandarización del inóculo.
Escala de McFarland 0.5



Sembrado de placas



Embebiendo el disco de papel filtro (10 ul) con ayuda de una micropipeta



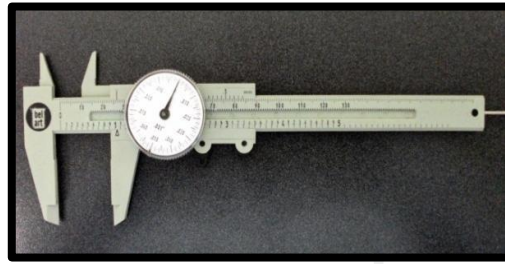
Colocación de los discos embebidos en la placa con ayuda de una pinza



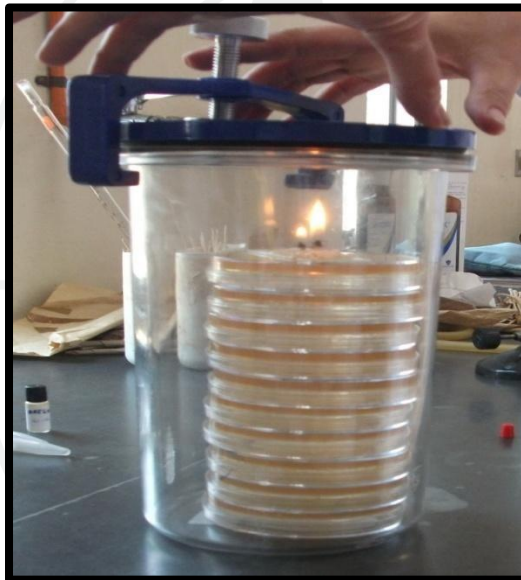
Micropipeta



Calibrador Vernier



Jarra de anaerobiosis (microaerofilia)

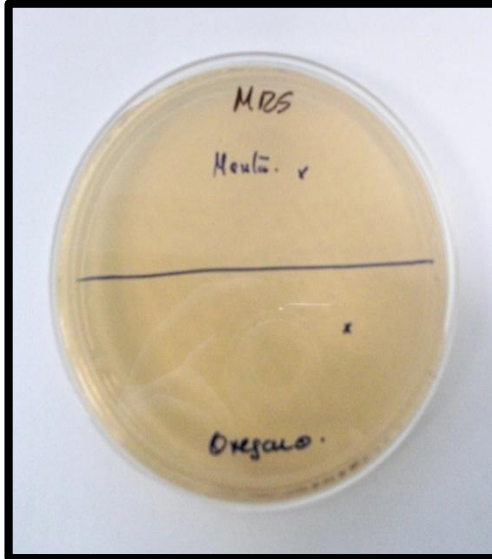


Incubación

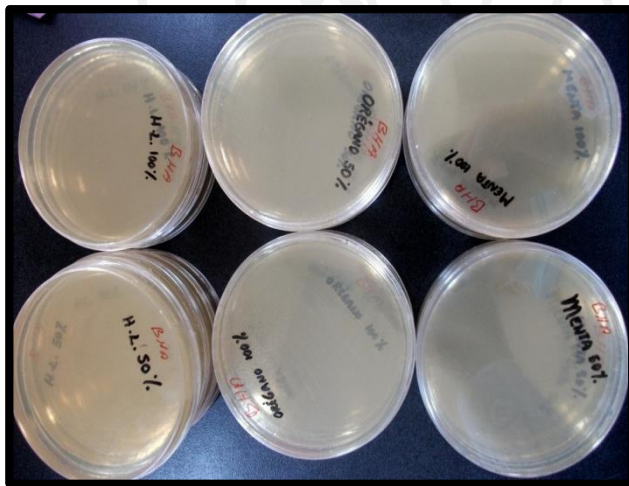


Anexo 5

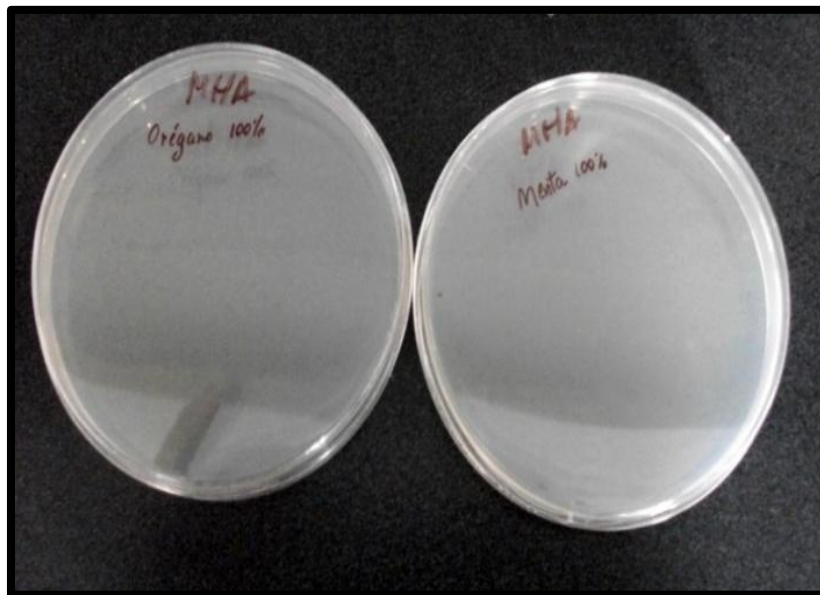
Medio de cultivo: MRS
para *Streptococcus mutans*



Medio de cultivo: BHA
para *Lactobacillus acidophilus*



**Medio de cultivo: MHA
para *Candida albicans***



Anexo 6

Lima, 02 de noviembre del 2011.

Solicito: Carta de presentación

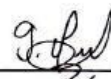
Sr.

Carlos Linares Weigl.
Decano de la Facultad de Odontología

Por medio de la presente yo Gisella Giovanna Maraví Inga, Estudiante de Odontología de la Universidad Privada Norbert Wiener, solicito se me otorgue una carta de presentación dirigida a la Dra. Mg. Dora Maurtua Torres, Jefa de Sección de Microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia para la ejecución de mi proyecto de Investigación titulado: "Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: *Menta piperita* (menta) , *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*"

Con el objetivo de realizar pruebas microbiológicas relacionadas con mi Proyecto de Investigación.

Sin otro particular me despido atentamente.



Gisella Maraví I.
DNI: 44288314



Anexo 7

Lima, 02 de noviembre del 2011.

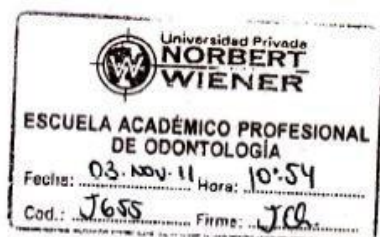
Solicito: Carta de aprobación para
ejecución de proyecto de Investigación


Sr.

Carlos Linares Weigl.
Decano de la Facultad de Odontología

Por medio de la presente yo Gisella Giovanna Maraví Inga, Estudiante de Odontología, con N° de matricula: a2006100806 solicito evaluación de mi Proyecto de Investigación titulado: "Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de: *Mentha piperita* (menta), *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Organum vulgare* (orégano) sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*" para la aprobación del mismo y continuar con su ejecución.

Le agradezco de antemano su rápida respuesta, me despido atentamente.




Gisella Giovanna Maraví Inga
Estudiante de Odontología

Anexo 8



Universidad Privada
**NORBERT
WIENER S.A.**
Calidad académica al alcance de todos



ISO 9001:2008

Lima, 05 de noviembre de 2011

CARTA N° 13-11-533-2011-DFCS-UPNW

Señora Doctora
Dora Maurtua Torres
Jefa de Sección de Microbiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia
Presente.

De mi consideración:

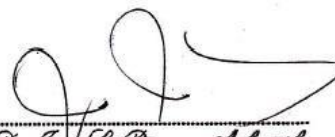
Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente a nombre de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Privada Norbert Wiener y aprovechando la oportunidad le informo que la Srta. Gisella Giovanna Maraví Inga, está ejecutando el proyecto de tesis titulado "Efecto antimicrobiano y antifúngico del aceite esencial de:

Mentha piperita (menta) y *Cymbopogon citratus (hierba luisa)* y *Origanum vulgare (oregano)* sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*, Lima 2011", para la obtención del Título Profesional de Cirujano Dentista; motivo por el cual solicito a usted la autorización para facilitarle el ingreso a su digna institución y poder aplicar los instrumentos de investigación.

Agradecido por su gentil atención a lo solicitado le manifiesto mi especial estima y consideración personal.

Atentamente,




Dr. José L. Piscocoya Arbañil
DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA SALUD

Anexo 9



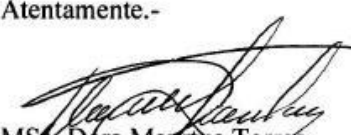
UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA

La que suscribe hace constar que la Srta. Bachiller: Gisella Giovanna Maraví Inga alumna de la Escuela Académico Profesional de la Facultad de Odontología de la Universidad Norbert Wiener, ha realizado la metodología del tema de tesis titulado: "Efecto antimicrobiano y antifúngico del aceite esencial de Menta piperita (Menta), Cymbopogon citratus (Hierba Luisa) y Origanum vulgare (Orégano) sobre Streptococcus mutans, Lactobacillus acidophilus y Cándida albicans" durante los meses de Enero- Abril del presente año en los laboratorios de Bacteriología de la Facultad de Ciencias y Filosofía del Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide la presente constancia al interesado para los fines que crea conveniente.

Atentamente.-


MSc. Dora Maritza Torres
Docente Microbiología – FCF - UPCH
CBP 776



Lima. 9 de Mayo del 2012

Anexo 10

LECTURA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Cepa *Streptococcus mutans* frente a clorhexidina y agua destilada

Control (+) y (-)



Cepa *Streptococcus mutans* frente a menta al 100 %

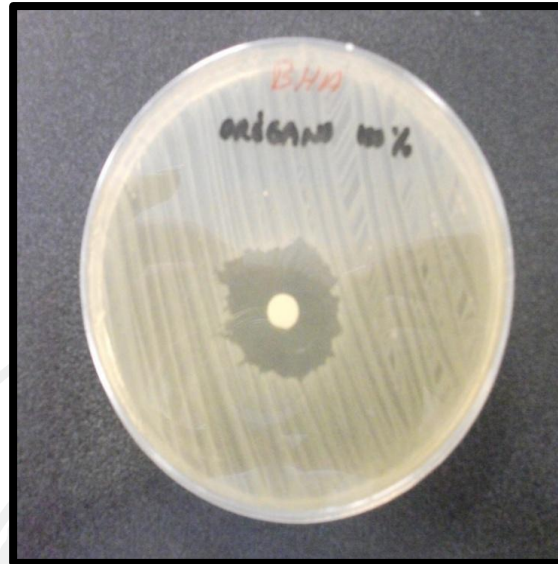


Cepa *Streptococcus mutans* frente a menta al 50 %



LECTURA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Cepa *Streptococcus mutans* frente a orégano al 100 %



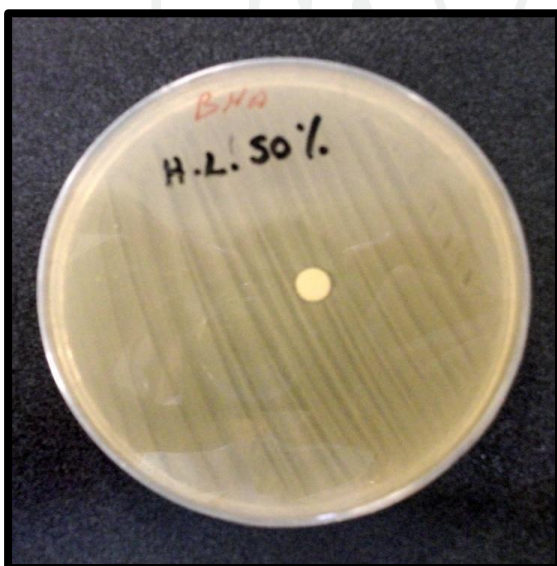
Cepa *Streptococcus mutans* frente a orégano al 50 %



Cepa *Streptococcus mutans* frente a hierba luisa al 100 %



Cepa *Streptococcus mutans* frente a hierba luisa al 50 %



LECTURA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a clorhexidina al 0,12 % (Control +)



Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a agua destilada (Control -)



Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a menta al 100 %

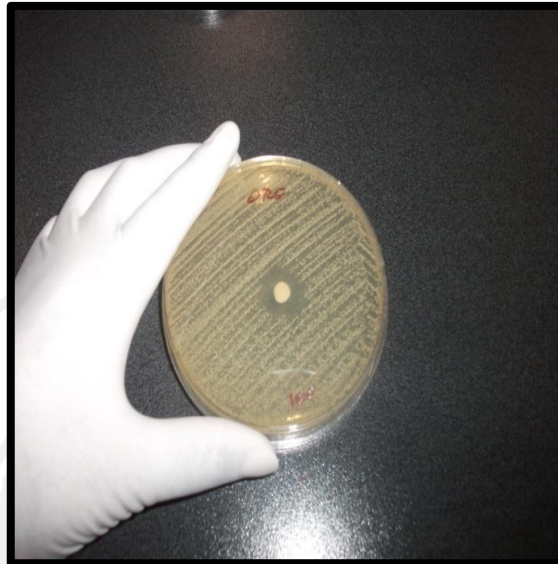


Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a menta al 50 %



LECTURA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a orégano al 100 %



Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a orégano al 50 %



Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a hierba luisa al 100 %

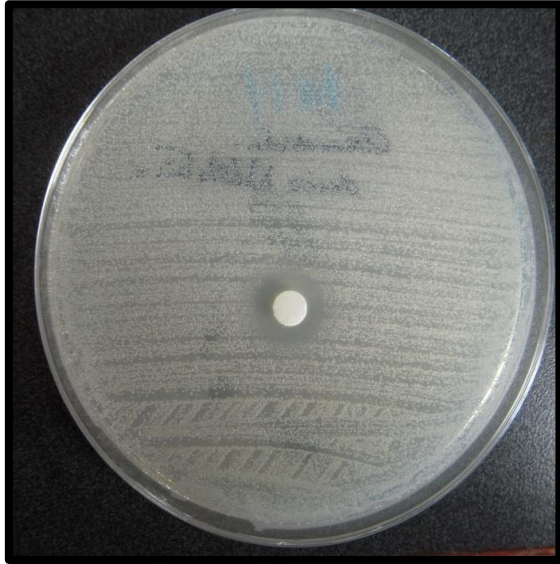


Cepa *Lactobacillus acidophilus* frente a hierba luisa al 50 %



LECTURA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

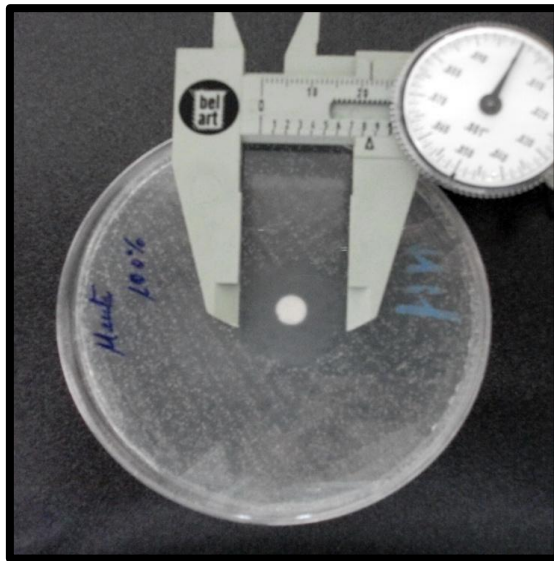
Cepa *Cándida albicans* frente a nistatina (Control +)



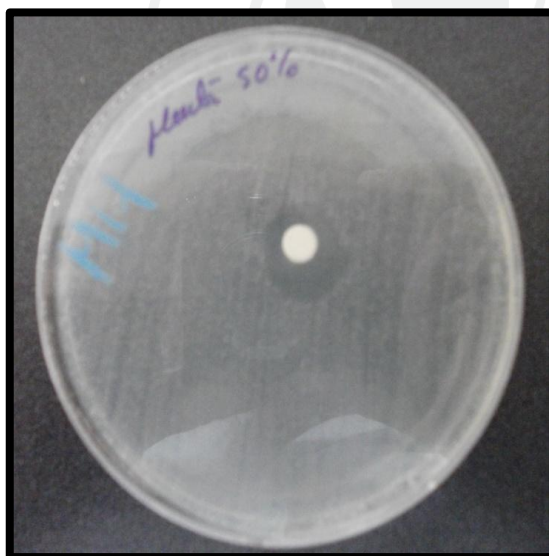
Cepa *Cándida albicans* frente a DMSO (Control -)



Cepa *Cándida albicans* frente a menta al 100 %

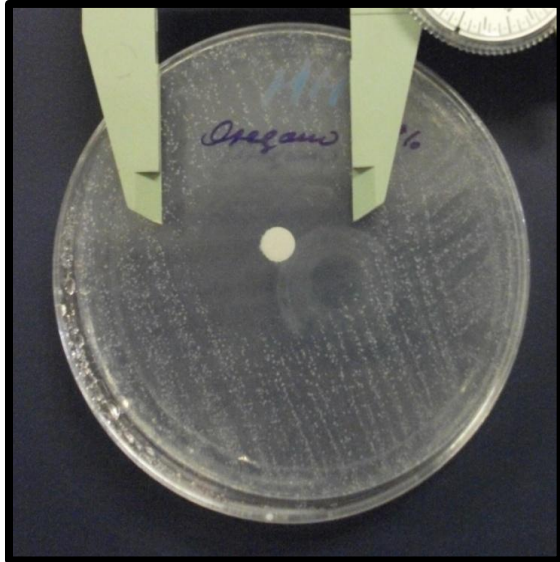


Cepa *Cándida albicans* frente a menta al 50 %

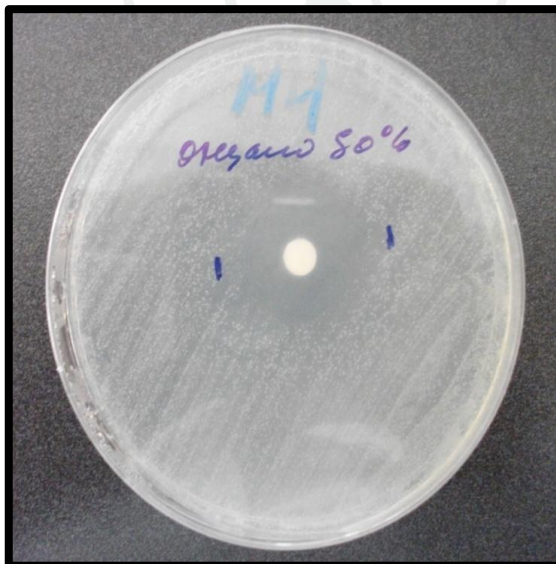


LECTURA DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

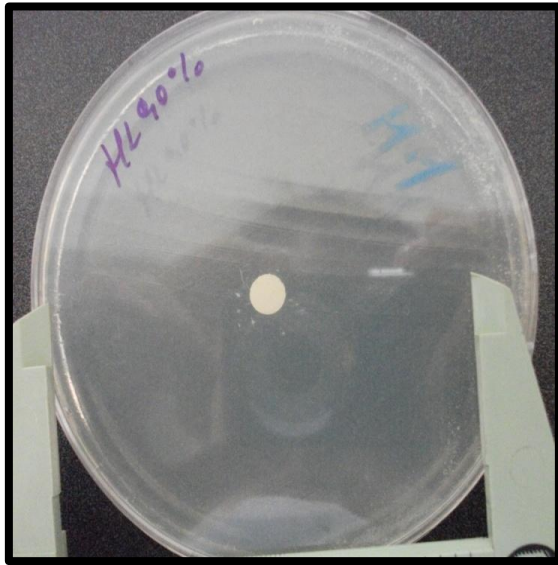
Cepa *Cándida albicans* frente a orégano al 100 %



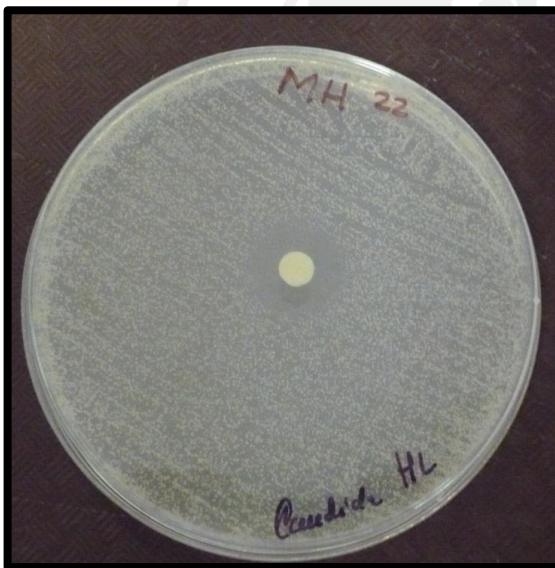
Cepa *Cándida albicans* frente a orégano al 50 %



Cepa *Cándida albicans* frente a hierba luisa al 90 %



Cepa *Cándida albicans* frente a hierba luisa al 50 %



LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA UPCH

