



UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ODONTOLOGIA

**“GRADO DE EFICACIA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Minthostachys mollis (muña) Y CLORHEXIDINA AL 0,12% EN LA
INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Porphyromonas gingivalis*.
ESTUDIO COMPARATIVO *IN VITRO*. LIMA 2016”.**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

Presentado por:

AUTOR : QUICHCA MENDOZA, JUAN CARLOS

ASESORA: DRA. AGUIRRE MORALES, ANITA KORI

LIMA – PERÚ

2017

Dedicatoria

A Dios, por el gran amor que me muestra en cada día de mí existir.

A mis queridos padres, por su ejemplo de entrega y dedicación, por ser los pilares de mí fortaleza e inspiración en la vida.

A mis hermanas por su confianza y apoyo en todo momento.

A mi hijo por ser esa fuente de alegría infinita que me brinda cada día y ser el motivo de seguir a delante.

Agradecimiento

Se agradece infinitamente la colaboración de la institución y el apoyo de todas aquellas personas que hicieron posible el desarrollo del este estudio

- Escuela Académica profesional de odontología de la Universidad Privada Norbert Wiener.
- Dra. Anita Kori Aguirre Morales, docente de periodoncia en la Escuela Académico profesional de odontología de la Universidad Privada Norbert Wiener, y asesora de la presente investigación; por su disposición y su apoyo e interés durante el desarrollo de todas las etapas de la misma.
- A los Dres. : Cesar Adrianzén y Federico Malpartida por compartir sus conocimientos de una manera desinteresada y por su gran calidez como personas.
- Y a todas las personas espaciales a las que me gustaría agradecer por su apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida.

Asesor de tesis:

Dra. Anita Kori Aguirre Morales

Jurado:

Presidente: Mg. CD Cesar Augusto Adrianzén Acurio

Secretario: Dr. CD Federico Martin Malpartida Quispe

Vocal: Mg. CD Esp. Renzo Nazario Riquero

ÍNDICE

| | Pág. |
|---|-----------|
| 1. CAPÍTULO I : EL PROBLEMA | 12 |
| 1.1. Planteamiento del problema | 12 |
| 1.2. Formulación del problema | 13 |
| 1.3. Justificación | 13 |
| 1.4. Objetivos | 14 |
| 1.4.1. Objetivos Generales | 14 |
| 1.4.2. Objetivos Específicos | 14 |
| 2. CAPÍTULO II : MARCO TEÓRICO | 15 |
| 2.1. Antecedentes | 15 |
| 2.2. Base teórica | 17 |
| 2.3. Terminología básica | 34 |
| 2.4. Hipótesis | 35 |
| 2.5. Variables | 36 |
| 3. CAPÍTULO III : DISEÑO Y METODO | 37 |
| 3.1. Tipo y nivel de investigación | 37 |
| 3.2. Población y muestra | 37 |
| 3.3. Técnica e instrumentos de recolección de datos | 37 |
| 3.4. Procesamiento de datos y análisis estadísticos | 40 |
| 3.5. Aspectos éticos | 40 |
| 4. CAPÍTULO IV : Resultados Y Discusión | 41 |
| 4.1. Resultado | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. Discusión | 49 |
| 5. CAPÍTULO V : Conclusión Y Recomendación | 50 |
| 5.1 Conclusión | 50 |
| 5.2 Recomendación | 51 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |
| ANEXO 1 | 58 |
| ANEXO 2 | 59 |
| ANEXO 3 | 60 |
| ANEXO 4 | 61 |
| ANEXO 5 | 62 |
| ANEXO 6 | 63 |
| ANEXO 7 | 64 |
| ANEXO 8 | 65 |
| ANEXO 8 | 66 |
| ANEXO 8 | 67 |

Índice Tablas/Gráficos

Pág.

TABLA N°1: Grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* 44
(muña) al 50% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

GRÁFICO N°1: Grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys* 45
mollis (muña) al 50% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

TABLA N°2: Grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* 46
(muña) al 100% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

GRÁFICO N°2: Grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys* 47
mollis (muña) al 100% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

TABLA N°3: Eficacia de la Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del 48
crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

GRÁFICO N°3: Eficacia de la Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del 49
crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

TABLA N°4: Comparar el grado de Eficacia generados por el aceite 50
esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 50%, 100% y Clorhexidina al
0.12% frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas

GRAFICO N° 4: Comparar el grado de Eficacia generados por el aceite 51
esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 50%, 100% y Clorhexidina al
0.12% frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

RESUMEN

Desde el inicio de la historia se ha evidenciado la presencia de la enfermedad periodontal, registrándose múltiples tratamientos a base derivados naturales frente a esta afección por lo tanto el presente estudio *in vitro*, tuvo como propósito determinar el grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) y Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*. La población estuvo conformada por 40 placas Petri con cepas de *Porphyromonas gingivalis*, en donde se aplicó el método de difusión en agar por discos, empleándose discos de papel embebidos con 20 ul de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 50%,100% así como Clorhexidina al 0.12% y agua destilada. Las placas Petri inoculadas y con medicación, fueron incubadas por 24 horas a 37°C, siendo retiradas únicamente al momento de medir los halos de inhibición, es decir a las 24 y 48 horas. Los datos se procesaron con la prueba estadística de análisis de varianza, obteniendo como resultado que las concentraciones al 50% y 100% del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) presentaron un halo de inhibición de $6.72 \pm 0.37\text{mm}$ y $10.81 \pm 0.79\text{mm}$ respectivamente a las 24 horas, mientras que $5.83 \pm 0.51\text{mm}$ y $8.24 \pm 0.75\text{mm}$ a las 48 horas respectivamente, mientras que la Clorhexidina mostró un halo de inhibición de $15.8 \pm 0.73\text{mm}$ a las 24 horas y $15.98 \pm 0.80\text{mm}$ a las 48 horas frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Concluyendo que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 50 %, 100% son menos eficaces que la Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas Gingivalis* a las 24 y 48 horas.

Palabras clave: Clorhexidina, *Minthostachys mollis*, *Porphyromonas gingivalis*

ABSTRACT

Since the beginning of history, the presence of periodontal disease has been evidenced, with multiple treatments based on natural derivatives against this condition. Therefore, the present in vitro study aimed to determine the degree of efficacy of the essential oil of *Minthostachys mollis*. (muña) and Chlorhexidine 0.12% in the growth inhibition of *Porphyromonas gingivalis*. This research was of an experimental type and be carried out in the microbiology laboratory of the Norbert Wiener Private University. The population consisted of 40 Petri plates with strains of *Porphyromonas gingivalis*, where the disc diffusion method was applied using discs of paper embedded with 20 ul of 50%, 100% *Minthostachys mollis* (muña) essential oil as well as 0.12% Chlorhexidine and distilled water. The inoculated and medicated Petri dishes were incubate for 24 hours at 37°C being withdrawn only at the time of measuring inhibition halos. That is at 24 and 48 hours. The data were processed with the statistical analysis of variance, obtaining as a result that the 50% and 100% concentration of the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) presented an inhibition halo of $6.72 \pm 0.37\text{mm}$ and $10.81 \pm 0.79\text{mm}$ respectively at 24 hours while $5.83 \pm 0.51\text{mm}$ y $8.24 \pm 0.75\text{mm}$ at 48 hours respectively. Whereas Chlorhexidine showed a halo of inhibition of $15.8 \pm 0.73\text{mm}$ at 24 hours and $15.98 \pm 0.80\text{mm}$ at 48 hours against strains of *Porphyromonas gingivalis*. Concluding that the essential oil of *Minthostachys mollis* (muña) at 50%, 100% are less effective than Chlorhexidine at 0.12% in inhibiting the growth of *Porphyromonas Gingivalis* at 24 and 48 hours.

Keywords: Clorhexidine, *Minthostachys mollis*, *Porphyromonas gingivalis*.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

Desde los inicios de la historia contemporánea los estudios paleontológicos han evidenciado la presencia de la enfermedad periodontal, registrando múltiples tratamientos primitivos frente a esta afección.(1) Las bacterias forman la mayor parte en la placa dental subgingival, por lo que estas se relacionan con las patologías periodontales entre estas tenemos a la periodontitis crónica que tiene como microorganismo prevalente a la *Porphyromonas gingivalis* siendo esta un microorganismo Gram negativo, anaerobio estricto, además se beneficia de la condición que muestra el huésped para causar mayor daño, así mismo produce diversos factores de virulencia no solo por la capacidad que tiene para invadir células periodontales sino también evadir al sistema de defensa del huésped.(2) En la actualidad la farmacopea menciona que el Digluconato de Clorhexidina es el antiséptico oral más utilizado en el tratamiento periodontal debido a su acción antimicrobiana, presentándose como bacteriostático y bactericida de acuerdo a su grado de concentración contra Gram negativos y Gram positivos.(3)

Las investigaciones en estos últimos años se han desarrollado relevantemente con el fin de encontrar medicamentos a partir de especies naturales (plantas) empleadas en tratamientos convencionales con el motivo de mejorar el comportamiento biológico (3)(5) y garantizar el uso que la medicina popular le otorga a diversas plantas naturales.(4)

1.2. Formulación del problema

¿Cuál será el grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) y Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*. Estudio comparativo *in vitro*. Lima 2016?

1.3. Justificación

La medicina natural ha sido utilizada desde el inicio de las civilizaciones antiguas como tratamiento médico general, asimismo en el campo odontológico se utilizó diversas combinaciones de hierbas medicinales para tratar problemas periodontales. En estos últimos años los enjuague bucales han tenido un rol importante en el control químico de la micro flora oral y que en ocasiones han presentado algunas afecciones debido a su composición química, por lo que se ha optado por un tratamiento a base de derivados naturales que presenta una ventaja favorable con respecto a los tratamientos químicos, debido a que no se acumulan en el organismo y sus efectos secundarios están limitados. Ya que este derivado natural (Aceite esencial de *Minthostachys mollis*) podría tener eficacia en la inhibición del crecimiento de bacterias predominantes de la periodontitis. Por lo que se ha tomado un gran interés en encontrar plantas medicinales con propiedades antimicrobianas.

El presente estudio pretende dar a conocer el poder antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos de la enfermedad periodontal para así consolidar futuras investigaciones odontológicas y brindar nuevas alternativas de solución a

problemas que aquejan nuestra sociedad ya que esta planta es de fácil obtención en nuestro país.

1.4. Objetivos

1.4.1 Objetivos generales

Evaluar el grado de eficacia del Aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) y Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*. Estudio comparativo *in vitro*. Lima 2016.

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 50% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.
2. Determinar el grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 100% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.
3. Determinar la eficacia de la Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.
4. Comparar el grado de eficacia generados por el aceite esencial *Minthostachys mollis* (muña) al 50%, 100% y Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

CAPÍTULO II: MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes

Aigaje A (2016) realizó una investigación experimental para determinar la efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 25, 50 y 100% frente a *Porphyromonas gingivalis*, llevándolo a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Central del Ecuador, concluyendo que la concentración que posee una mejor efectividad antimicrobiana pertenece al aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100% con un halo promedio de 13,6mm.

Carhuaricra Y (2015) realizó un estudio de tipo experimental sobre el efecto inhibidor del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) y Clorhexidina al 0.12% sobre *Porphyromonas gingivalis*, realizándolo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Privada Norbert Wiener. Se concluyó que el efecto inhibidor del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) fue menor que la Clorhexidina al 0.12 % sobre *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

Huari G (2014) evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* en *Streptococcus mutans*, se prepararon diluciones del aceite esencial al 100%, 50% y 25% concluyendo que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100% presentó un mayor efecto antibacteriano que las otras diluciones, sin embargo al compararlo con el control positivo (amoxicilina) presentó un menor efecto antibacteriano.

Figueroa G (2014) realizó un estudio experimental para determinar la eficacia del aceite esencial del *Minthostachys mollis* al 100%, 75% y 50% en comparación al Gluconato de Clorhexidina al 0.12% en la inhibición bacteriana del *Streptococcus mutans*, concluyendo que el efecto inhibidor mayor pertenece al Gluconato de Clorhexidina al 0.12% y el segundo mejor efecto inhibidor lo presentó el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 75% a las 24 horas frente a cepas de *Streptococcus mutans*.

Azaña I (2010) realizó un estudio de tipo experimental para determinar la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* griseb (muña) frente a *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica* y *Enterococcus faecalis*. Se concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* puro presento una efectividad antibacteriana mayor en comparación a las diluciones al 50%, 25% y alcohol etílico 70° frente a las cepas de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella melaninogénica*, *Enterococcus faecalis* y a la muestra del conducto radicular pero menor al Paramonoclorofenol alcanforado.

Malpartida F (2010) realizó un estudio con el fin de determinar el efecto inhibidor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación al Paramonoclorofenol alcanforado y Gluconato de Clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, concluyendo que el efecto inhibidor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) fue menor que el Paramonoclorofenol alcanforado y Gluconato de Clorhexidina al 2% frente a *Enterococcus faecalis* tanto a las 24 como a las 72 horas.

Fernández K, García C (2009) realizaron una investigación experimental para determinar la efectividad antibacteriana de la solución a base de *Camelia sinensis* al 15% (Té verde) y *Minthostachys mollis* al 30% (muña) frente a la flora salival mixta en pacientes Ortodónticos, se recolecto las 30 muestras de saliva no estimulada del servicio de ortodoncia y ortopedia maxilar del Instituto de Salud del Niño. Se Concluyó que solución a base de *Minthostachys mollis* presento mayor efectividad antibacteriana siendo esta la solución de efectividad similar a la Clorhexidina y Vitis Ortodónticos (colutorio).

2.2. Base teórica

2.2.1 Enfermedad periodontal

El periodonto está conformado por los tejidos de soporte dentario entre ellos tenemos a la encía, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar; que actúan en la protección e inserción, así mismo estos tejidos están sujetos a variaciones morfológicas y funcionales, así como alteraciones por la edad. (1) El inicio de las enfermedades periodontales es causada por placa bacteriana y patógenos específicos. Encontrando dos grandes grupos: primera etapa la gingivitis, la cual se presenta por la acumulación de placa bacteriana que inicia la gravedad de la lesión, observándose clínicamente una inflamación gingival. Si se agrava pasa a una segunda etapa la periodontitis, que se caracteriza por un sobre crecimiento bacteriano en la placa subgingival; afectando a los tejidos de soporte del diente, por lo que causa perdida de inserción conectiva, presencia de bolsas periodontales, reabsorción ósea e inflamación en grados variables siendo el principal motivo la pérdida dental en adultos, por lo que trae consigo problemas relacionados con lo estético, fisiológico y psicológico (6) además considerada

como un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, diabetes, parto prematuro y niños de bajo peso al nacer. (1)(7)

2.2.2 Etiopatogenia

Diversas investigaciones han comprobado que las enfermedades periodontales son de origen infeccioso y que las bacterias Gram negativas presentes en la placa bacteriana subgingival, conforma el principal agente etiológico. (6)

Las distintas ubicaciones de las bacterias son trascendentales (1), algunas colonizan la superficie dentaria, como la zona supragingival, donde se incrementan y se propagan hacia apical, situándose en la placa subgingival, siendo el lugar ideal de los microorganismos anaerobios. (6) Se han hallado más de 500 de estas especies bacterianas (1) (8). Por lo tanto la micro flora subgingival es un sistema ecológico donde existen interacciones estructurales y fisiológicas entre bacterias (coagregación), como también con el huésped. Entre las cuales se consideran como patógenos periodontales a la *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (7) (8) prevalentes en la periodontitis (6), estas dos ultima están más relacionadas con la progresión de la enfermedad por su capacidad de invadir células periodontales. (1)(7)

2.2.3 Formación de la placa dental subgingival

La placa dental es definida como un depósito microbiano natural, que se compone de microorganismos incluido en una matriz formada por productos salivales (polímeros extracelulares). (1)

Cuando se da una incorrecta higiene supragingival se crea la placa dental por interacción dinámica bacteriana. Las bacterias en la placa supragingival como

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrinus* y otras bacterias Gram positivas (colonizadores primarios) (6) se adhieren a la película mediante las adhesinas presentes en su parte externa que actúan como receptores. Es en esta etapa donde se inicia la transición de un ambiente aerobio a un anaerobio. (1)

La placa supragingival contiene componentes bioactivos (ácidos orgánicos fermentados, componentes sulfurosos) que se difunden hacia la superficie del epitelio gingival, haciendo que se incremente el fluido crevicular gingival y fluido inflamatorio, debido a este aporte nutricional el hospedador es susceptible a bacterias proteolíticas que producen proteasas, los cuales crean condiciones ideales para el establecimiento de la placa subgingival; entre estas podemos mencionar a la *Porphyromonas gingivalis* que secretan proteasas, estas estarían involucradas en la inicio de la enfermedad periodontal. (6)

En la colonización secundaria las bacterias Gram negativas localizadas en la placa dental subgingival se adhieren a células ya presentes en la placa, mientras que en otras investigaciones han mostrado la capacidad de interacción con otras especies bacterianas denominando a este mecanismo coagregación, además de fuerzas de atracción de Van der Waals en bacterias de diferente especie. (1)

2.2.4 Clasificación de la enfermedad periodontal

- ✓ Enfermedades gingivales
- ✓ Periodontitis crónica
- ✓ Periodontitis agresiva
- ✓ Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas
- ✓ Enfermedad periodontal necrotizante
- ✓ Abscesos del periodonto
- ✓ Periodontitis asociadas a lesiones endodónticas
- ✓ Deformidades del desarrollo o adquiridas (1) (8)

2.3 Porphyromonas

Las *Porphyromonas* pertenecen a la familia *Bacteroidaceae* que producen en conjunto una pigmentación marrón oscura, son Gram negativos, anaerobios, estrictos, no móviles, siendo bacterias asacarolíticas (no metabolizan hidratos de carbono) y que emplean compuestos nitrogenados como fuente energética. (9) Este género está relacionado con la patología humana como la *Porphyromonas asacharolytica* presente en la patología extra oral (forman parte de la microbiota normal del colon y la vagina), mientras que las *Porphyromonas gingivalis*, *endodontalis* y la *catoniae* forman parte de la cavidad oral, siendo estas su hábitat natural. (10)

2.3.1 Porphyromonas gingivalis

Son bacterias Gram negativas (7), anaerobias, inmóviles (10) y asacarolíticas (11) (8) (10) que forman colonias uniformes de coloraciones negras debido a la hemina almacenada en la superficie celular. (6)(30) Cuando se desarrolla en agar sangre al principio toman un color amarillento que al pasar los días estas colonias se pigmentan de negro, por su capacidad de captar hierro (cultivo).

Este microorganismo está muy relacionado con el inicio y progresión de la enfermedad periodontal (crónica, agresiva), además forman parte del complejo rojo del modelo de colonizadores propuesto por Hafajee y Socranski, ya que se le considera uno de los colonizadores secundarios. (11)(29)(31)

En estudios *in vitro* se ha comprobado la capacidad de invasión de éste patógeno a las células del surco gingival, limitando su exposición al espacio extracelular, evitando así la respuesta inmune (huésped) (27), además inhiben la producción

de IL-8, ya que esta suprime la acción de los neutrófilos en el surco gingival. (11)(28)

La *Porphyromonas gingivalis* es detectada con pruebas de biología molecular (PCR) y métodos inmunológicos en pacientes jóvenes con gingivitis, pacientes adultos con periodontitis, además encontrándose en placas supragingivales maduras de pacientes jóvenes con o sin destrucción periodontal; por lo cual es considerado como patógeno de tipo oportunista, es así que aún no está claro si su origen es endógeno o exógeno. (6)

2.3.1.1 Morfología y estructura

Esta especie celular tiene una forma de cocobacilo con un diámetro de 0.5- 0.8µm por 1.0 - 3.5µm de largo (6) (12) (13), encontrando endotoxinas (capsulados) en su pared celular, con gran cantidad fimbrias en la parte externa y con presencia de vesículas que contienen enzimas, por lo que toman un papel importante en su virulencia. (9)

2.3.1.2 Factores de virulencia

Lo que define como virulento a un microorganismo es la cualidad de producir metabolitos tóxicos, enzimas, toxinas y evadir los mecanismos de defensa del huésped. (7)(13)

Los factores de virulencia están encaminados a la obtención de hierro y péptidos como fuente de energía (a partir de la hemina), la cual la obtiene de la disgregación (1) de la hemoglobina, metahemoglobina, haptoglobina, mioglobina, oxihemoglobina, lactoperoxidasa, catalasa, albúmina. (7)

Entre estos factores encontramos:

- ✓ **Cápsula:** cumple un rol importante eludiendo el sistema inmunológico, evitando la fagocitosis, opsonización y accionar del complemento. Se compone de polisacáridos. (2) Sobre la base de su inmunogenicidad se han descrito 6 serotipos capsulares de K1 – K6. (7)
- ✓ **Membrana externa:** existen algunas proteínas que actúan como adhesinas, la cual permite la adhesión y coagregación bacteriana; participando así en la colonización, formación y mantenimiento de la flora subgingival. (9) (13)
- ✓ **Fimbrias:** Es el principal factor de virulencia (11) (24), ya que tiene la capacidad de adherirse a diferentes sustratos, moléculas y células (epitelial, fibrinogeno, fibronectina, lactoferrina) (2) (26); además invaden a los tejidos periodontales mediante sus estructuras filamentosas ubicadas en la superficie de la bacteria (7) que miden aproximadamente 0.3 a 1.6 nm de longitud y 5 nm de Ancho. (12) (11)
- ✓ **Lipopolisacáridos:** (vesículas de la membrana externa) se ubican a una distancia más alejada de la bacteria en forma de sacos encontrando en su interior una variedad de enzimas como fosfolípasa C, proteasas, fosfatasa alcalina, hemolisinas causando daños a los neutrófilos (activa la sobreproducción de citoquinas) y a las células periodontales (invaden). (2) (7)
- ✓ **Endotoxina** (Lipopolisacárido): formada en parte por el lípido A que se encuentra en la membrana externa de la bacteria interviniendo en la suspensión de la homeostasis inmunológica, causando la inflamación gingival y la destrucción del tejido conectivo así como la reabsorción del hueso alveolar por la activación de osteoclastos induciendo la liberación de prostaglandinas E2, así como un incremento de IL18 y IL1B. (2)
- ✓ **Proteínasas cisteinproteasas:** Estas proteínas son conocidas como Gingipain, que producen el 85 % de la actividad proteolítica ocasionada por la

bacteria y el 100 % de la acción tipo tripsina. Las gingipain es el resultado de 3 genes *rgpA*, *rgpB*, *Kgp*. ya que causan la degradación de fibronectina, fibrinógeno y de las uniones de las células epiteliales; además la activación del sistema de coagulación y por último interrumpe el sistema de defensa del huésped al degradar IL.(2)

- ✓ **Proteasas:** por medio de las proteasas la bacteria logra su función de penetración, multiplicación y diseminación, obteniendo así nutrientes de los tejidos del huésped, induciendo importantes cambios en el deterioro tisular. La *Porphyromonas gingivalis* produce una gran variedad de enzimas proteolíticas; muchas de estas se unen a la membrana externa y otras se dispersan al exterior o son trasladadas por las vesículas superficiales.(9)(13)
- ✓ **Hemaglutininas:** Estas son proteínas ubicadas en la membrana externa que inducen la aglutinación de los eritrocitos, debido a que la bacteria requiere de hemo para su crecimiento, están codificadas del gen *hag* y estas son A,B,C,D,E. (11)

2.3.1.3 Fisiopatología

Al inicio las bacterias colonizadoras primarias una vez ya instaladas acondicionan el medio para los colonizadores secundarios (no se desarrollan en superficies dentarias limpias) uno de estos es la *Porphyromonas gingivalis* ; el cual se adhiere con la *Fusobacterium Nucleatum*, ya que este último reduce el pH del medio y además proporciona un medio ideal para la proliferación de *Porphyromonas gingivalis* . (1)

La *Porphyromonas gingivalis* es considerado un comensal del surco gingival. Se ha determinado que puede ser transmitido por contagio directo de saliva por individuos infectados (30), esto desencadenaría la colonización en el surco

gingival; debido a sus factores de virulencia, causando la invasión de las células epiteliales en un tiempo aproximado de 20 minutos en el que se multiplicaran y se diseminaran a las demás células del medio originando alteraciones en los tejidos periodontales. (9)

2.3.1.4 Nutrición

Esta especie es proteolítica, asacarolítica, anaerobia estricta, ya que se desarrollan en lugares de baja oxigenación, pero con la presencia de algunos substratos de nitrógeno. El hábitat subgingival brinda un lugar ideal para esta especie, por lo que el pH (potencial hidrogeno) es menor a lo habitual debido a presencia de *Fusobacterium nucleatum* (1) y a su vez, el habitat dispone de nutrientes endógenos ricos en péptidos y aminoácidos. (6)

Las *Porphyromonas gingivalis* necesitan de hemina y hierro para proporcionar una importante fuente de crecimiento (1) (25), además cuando hay una carencia de hierro en su sistema de poros consume la hemina del medio. El nivel de hemina en la cavidad oral es variable y el sangrado es el resultado de la inflamación gingival lo que incrementa la concentración subgingival, este podría ser un factor que ocasionaría la acumulación de la bacteria. (6)

2.4 Planta medicinales

Se le conoce como droga vegetal a la parte de la planta empleada a la medicina, cuyo suministro son administrados bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, decocción, elixir, infusión, aceites esenciales, jarabe, pomada, tintura, ungüento sirviendo como tratamiento de algunas afecciones. La presencia de terpenoides, encontradas en proporciones pequeñas en los aceites esenciales explicaría las propiedades antimicrobianas (14)

2.4.1 *Minthostachys mollis*

La *Minthostachys mollis*, es el nombre científico de la “muña”, esta es una planta que habita en los distintos pisos ecológicos de la serranía peruana, además es un recurso natural que crece entre los 2500 – 3500 msnm. (14) Esta planta es conocida con el nombre de muña” en la lengua quechua, en Aymara conocida con los nombres de “Coa” y “Huaycha”. Debido a las semejanzas con el póleo y orégano los españoles lo denominaron poleo silvestre. Otros nombres comunes con los que se le conoce son: "Muña negra", "Polco silvestre", "coz", "muña-muña", "arash muña", "kon" "Orcco-muña". (5)(12)(15)(35)

La muña es una planta hemicriptófila que en épocas frías de invierno sus órganos aéreos desaparecen y a inicios de la primavera brotan llegando alcanzar una altura de 0.80 a 1.50 m, su hábitat de crecimiento son en acequias y manantiales, requiriendo así pocas cantidades de agua. Se desarrollan en suelos ricos en materia orgánica y un buen clima, floreciendo en tiempos de lluvia, multiplicándose por semilla y codo. (12)(15)(35)

2.4.1.1 Taxonomía

| | |
|----------------------|--|
| Reino | Vegetal |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Sub clase | Asteridae |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Lamiaceae (Labiatae) |
| Género | <i>Minthostachys (Benth) Spach</i> |
| Especie | <i>Minthostachys mollis (Kunth) Grisebach</i> |
| Nombre vulgar | “Muña” |

(15)(16)

2.4.1.2 Moléculas presentes en *Minthostachys mollis* (Muña)

- *Pulegona*

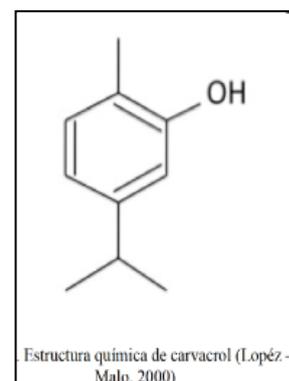
Es un compuesto natural que aparece en muchos aceites esenciales, son altamente tóxicos a grandes proporciones debido a esto presentan efectos contra las plagas y parásitos, mientras que en la persona puede provocar alteración en el hígado y aborto espontáneo, además esta sustancia es usada en perfumería y como saborizante. (12)

- *Mentona*

Este también es un componente importante ya que junto a la pulegona representa un 75% del aceite, tiene un aroma a menta y no solo se usa en perfumería si no también empleado en problemas digestivos. (12)

- *Carvacrol*

Se encuentra en diversas hierbas, pero en mayor porcentaje en el aceite esencial de *Origanum vulgare* (oregano) del 60-70%. el *carvacrol* es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias gram negativas (39), además se emplea como complemento para sazonar (condimento). (12)



- *Carvona*

Es una sustancia conocida de la semilla de alcaravea (*Carum carvi*), presenta propiedades digestivas, además sirve como complemento para sazonar. (12)

- *Mentol*

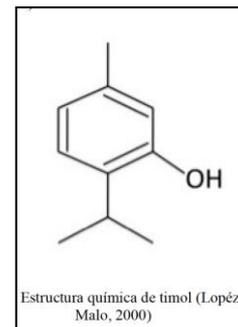
Se utiliza para adormecer el dolor y para el dolor de garganta, siendo este un componente menor del aceite esencial *Minthostachys mollis*. (12)

- *Linalol*

Se le conoce como cilantro (*Coriandrum sativum*) de la familia Apiaceae, es un componente menores del aceite esencial *Minthostachys mollis*. Se utiliza como insecticida y en ocasiones como condimento. (12)

- *Timol*

Se encuentra en porcentaje menor en el aceite esencial de *Minthostachys Mollis* pero en mayor porcentaje en el aceite esencial del *Thymus serpyllum* (tomillo) más del 50% y su mecanismo de acción es similar al *carvacrol* (39), Utilizándose como antiséptico, también empleado contra el dolor de garganta y tos. (12)



2.4.1.3 Composición nutritiva de *Minthostachys mollis* (muña)

En 100 gr. de parte comestible

COMPONENTES MAYORES:

| | |
|---------------|-------------|
| Agua | 16 ug. % |
| Proteínas | 3.20 ug. % |
| Grasas | 2.80 ug. % |
| Carbohidratos | 66.30 ug. % |
| Fibras | 9.40 ug. % |
| Cenizas | 11.70 ug. % |

VITAMINAS:

| | |
|---------------|-------------|
| Retinol | 306 ug. % |
| Tiamina | 0.35 ug. % |
| Riboflavina | 1.81 ug. % |
| Niacina | 6.85 ug. % |
| Ac. Ascórbico | 21.10 ug. % |

MINERALES:

| | |
|---------|-------------|
| Calcio | 2.24 ug. % |
| Fósforo | 269 ug. % |
| Hierro | 22.40 ug. % |

OTROS COMPONENTES:

| | |
|----------------|-------------|
| Ácidos débiles | 2.54 ug. % |
| Esteres | 14.02 ug. % |
| Tanino | Positivo |
| Resinas | Positivo |
| Fenoles | Positivo |
| Alcoholes | Positivo |
| Aldehídos | Positivo |
| Cetonas | Positivo |
| Carbonilo | 22.06 ug. % |
| Mentol | 40.42 ug. % |

(12)

2.4.1.4 Aspecto botánico

Pertenece a la familia de plantas arbustivas, de olor característico (4), leñoso, frondosa (parte superior) que presentan abundantes ramas desde su base. Su hoja es vegetativa de contornos dentados. El peciolo tiene un promedio de 4 a 6mm de largo, presenta una superficie vellosa, acanalada (parte superior) y de forma convexa (parte inferior) siendo este uno de los lugares en donde se depositan gran cantidad del aceite esencial.

Por otro lado los pelos de los tallos y de las hojas, crean una capa protectora contra las diferentes temperaturas siendo estos los lugares donde también se almacena el aceite esencial. Sus flores son pequeñas, reunidas en cortos racimos, ubicadas en la parte superior de las ramas. (12)

2.4.1.5 Propiedades y usos

La muña se ha empleado desde tiempos remotos (pre-incas) debido a sus propiedades medicinales (12) (32) empleándolas como infusión (13) contra los distintos problemas digestivos (cólicos, flatulencia, vómitos, diarreas) de la misma manera como expectorante, analgésico, antitusígeno, antiasmático, antiespasmódico, antiséptico, antiinflamatorio, antipirético, antiparasitario (presentan activos como pulegona, mentona), además como medicación en tumores (mezclándola con chilca) y en fracturas (mezclándola con clara de huevo). En algunos lugares lo emplean como saborizantes en las comidas típicas (por su alto valor proteico) y contra el soroche (mal de altura). (12)(14)(17).

La presencia de minerales como el calcio y fosforo favorecen el crecimiento de los huesos y evitan la aparición de la osteoporosis, así mismo mejoran el desarrollo de la dentición de niños y adultos. (13)

En el área bucal lo emplean coadyuvante en el tratamiento de halitosis (12) y odontalgias (masticando las hojas). (35)

En el campo agrícola se utiliza para proteger las papas y otros tubérculos de los insectos, como fumigante natural contra gorgojos (andino), *Gnorimoschema* (polillas y larvas) y contra hongos. (5)(12)(32)

En el campo pecuario se utiliza para tratar la sarna de los equinos, camélidos (12) y en el tratamiento de los parásitos (en animales domésticos). (5)

En algunos países latinoamericanos se emplean para fabricar bebidas, licores y aromatizantes. (12)

En los laboratorios de Austria y Suiza se descubrió que la estructura química de la muña beneficia al tratamiento de algunos problemas oculares. (5)(18)

En algunas provincias del Perú (Ayacucho) se emplea la muña en la fabricación de la pólvora conocido como Q'oa muña, que es extraída de sus tallos (cargados de resina) siendo estos utilizados en celebraciones costumbristas como fuego artificiales (5) (18) inclusive en otras lugares lo emplean como preservante natural de alimentos. (20)

2.4.1.6 Constitución química

El aceites esencial de *Minthostachys mollis* están conformados por aldehídos, cetonas, alcoholes (mentol y mentona), ésteres, éteres que representan el 10.2 % mientras que los terpenos presentan un 89.8 %, lo cual caracteriza su aroma. (12)(17)

2.4.1.7 Mecanismos de acción

No existe suficiente información sobre el mecanismo de acción del aceite esencial, pero se conoce que defiende a la planta de agentes externos y por su capacidad antioxidante. El aceite esencial de *Minthostachys mollis* presentan actividad antimicrobiana debido a sus compuestos químicos encontrados como los fenoles isoméricos, carvacrol y el timol, también por su bajo pH y su afinidad de adherirse a superficies hidrofóbicas; tanto a proteínas como a la bicapa lipídica de la bacteria, produciendo pérdida de su integridad y salida del material celular (iones, ATP y ácidos nucleicos) (5) (17) y actividad antifúngica (controlando el crecimiento de los hongos). En estudios se han reportado que las bacterias Gram negativas presentan menos resistencia a la acción del aceite debido a sus cadenas alifáticas. (5)

2.4.1.8 Hidrodestilación de aceite esencial *Minthostachys mollis* (muña)

La Hidrodestilación (HD) o destilación por arrastre con vapor es el método más empleado para extraer aceites esenciales debido a que no se usa ningún solvente (12) ya que tiene como función separar sustancias volátiles de otras sustancias menos volátiles. (19) El método consiste en colocar agua y la cantidad de muña requerida dentro del recipiente extractor, después se procede a hervir el contenido. Es necesario recalcar que el agua no está en contacto directo con el material vegetal, luego pasa a través de una trampa de destilación en forma de vapor. Este vapor producido arrastra los aceites esenciales de la planta 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). (19) Se deja en reposo hasta observar la separación del

agua y del aceite, para después separar el aceite del agua por simple diferencia de densidades. (12)

Algunos autores mencionan que se puede separar el aceite del agua mediante el uso de una pipeta (12), mientras que otros autores añaden sulfato de sodio anhidro (para formar cristales con el agua) para luego filtrarlo y obtener el aceite esencial (15). Finalmente se deposita en frascos oscuros estériles y se cierra herméticamente, luego se almacena en refrigeración para su uso. (19)

2.5 Enjuague Oral

Es un agente químico con un mecanismo directo en la cavidad oral lo cual debe contar con la suficiente concentración para tener una acción bacteriostática o bactericida, obteniendo así resultados antimicrobianos positivos. (37)

2.5.1 Clorhexidina

Forman parte de la familia de los halógenos, está compuesto por dos guanidas unidas a un puente de metileno con seis carbonos y un pH superior a 3.5. Su actividad es contra bacterias aerobias y anaerobias (Gram positivas y Gram negativas), así como hongos, levaduras y virus. (5) En investigaciones no se ha encontrado resistencia reconocible de microorganismos bucales y no ocasionan defectos congénitos. (1)

Este enjuague actualmente utilizado, ha mostrado ser el agente más eficaz (antimicrobiano químico), no presenta toxicidad y actúa como agente bacteriostático o bactericida de acuerdo a su concentración en que sea empleada. (5) Su uso está indicado en el tratamiento de enfermedades periodontales. (3)

2.5.2 Historia

Se inicia en Inglaterra en los años 40 con una investigación contra la malaria y en 1954 se distribuye como antiséptico (heridas de piel). En el transcurso de los años se empleó en medicina y cirugía. A inicios de la década del 70 las investigaciones de Loe y Schiott dieron a conocer el uso de la Clorhexidina en el campo Odontológico (Periodoncia) donde se demostró que inhibe la formación y desarrollo de la placa bacteriana. (3)(8) (36)

2.5.3 Mecanismo de acción

Se inicia con el ingreso y la alteración de la membrana celular bacteriana (3) debido a su absorción pasiva a los 20 segundos (21), causando a bajas concentraciones un cambio de la permeabilidad osmótica con filtración de los componentes intracelulares, incluyendo el potasio (acción bacteriostática) (17) y a concentración alta provoca precipitación del citoplasma (interferiendo con la función) y muerte celular (acción bactericida).(3) En la cavidad oral la Clorhexidina es absorbida por diferentes superficies (dentarias, mucosas, películas adquiridas, proteínas salivales y la hidroxiapatita) que son liberadas (fluidos orales) (3) durante un periodo de 8 a 12 horas de forma activa (sustantividad). (17)

2.5.4 Reacción adversas

El uso constante de la Clorhexidina causa reacciones locales reversibles, como manchas (pardas) en superficies dentarias, lengua y restauraciones, además causan modificaciones en la percepción gustativa (salado). (1) Por otra parte el uso de la Clorhexidina en gel presenta efectos retardados en relación con el colutorio. (17) Asimismo se ha encontrado erosiones en la mucosa que ocasionalmente puede provocar una tumefacción (unilateral o bilateral).

Finalmente todas estas reacciones se pueden solucionar con la suspensión de la Clorhexidina. (22)

2.5.5 Presentación de la clorhexidina

La primeras soluciones de Clorhexidina 0.2% como enjuague bucal aparecen en Europa en los años 70, años más tarde en EEUU se fabricó al 0.12%. En estudios posteriores se demostró que los enjuagues en ambas concentraciones (0.2% y 0.12%) presentaron eficacias similares con dosis iguales. (8)

El PERIO-AID® este colutorio se combina de digluconato de clorhexidina 0.12% y cloruro de cetilpiridinio 0.05%, presentando buenos resultados en el control de la micro flora oral. (37)

La Clorhexidina 0.12% (PERIO-AID®) garantiza la eficacia antimicrobiana en todo tipo de problemas periodontales y periimplantarios, además de que el producto permite eliminar el biofilm patógeno causante de la enfermedad. El Perio-Aid® 0.12% (Tratamiento) está disponible en diferentes presentaciones en el mercado según el uso y la indicación:

- Spray: indicado a personas que no pueden realizar un correcto cepillado o enjuague bucal.
- Gel: utilizado como gel dentífrico mediante el uso de un cepillo dental suave y como gel tópico para aplicación mediante una gasa en zonas que requieran una protección antiséptica.
- Colutorio: controla la carga microbiana y está indicado dos veces al día debido a que la clorhexidina es liberada gradualmente durante un periodo de 8 a 12 horas. (38)

2.5.6 Indicaciones

La Clorhexidina es el agente más empleado y eficiente en la inhibición de la placa bacteriana además previene la gingivitis (8), a su vez se emplea en el tratamiento de enfermedades periodontales y en cirugías como irrigantes (alveolitis), desinfectante (estomatitis protésica por candidiasis), en el tratamiento de aftas y por último como ayuda en el tratamiento del mal aliento (halitosis). Se recomienda usar dos veces al día como enjuague bucal una cantidad de 10 ml de esta solución. (1)(3)

2.6 Terminología Básica

- **Porphyromonas gingivalis:** es un bacilo Gram negativo predominante en la periodontitis crónica, sus múltiples factores de virulencia la hacen sumamente agresiva. (2)

- **Aceite esencial:** los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas provenientes de las plantas, que dan ciertas características a flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal. Químicamente están formados por monoterpenos y algunos sesquiterpenos, y compuestos aromáticos. (12)

- **Antiséptico:** es todo agente físico o químico que se opone al desarrollo de los microorganismos, sin que necesariamente ejerza sobre ellos una acción mortal. Los antisépticos pueden actuar impidiendo el desarrollo de los gérmenes (antiséptico bactericida). (17)

- **Bacteriostático:** aquel agente que frena o detiene el crecimiento bacteriano. (17)

- **Bactericida:** aquel agente que destruye o mata a los microorganismos. (17)
- **Cepa bacteriana:** todos los organismos descendientes de un cultivo puro, por tanto, con fenotipo y genotipo definidos. (12)
- **ATCC:** colección americana de cultivos tipo. (17)
- **Efectividad Antibacteriana:** cualidad de un fármaco o agente químico determinado consistente en eliminar o inhibir el crecimiento de las bacterias patógenas que se desarrollan en un medio dado, al actuar sobre ellas indirecta (obstaculizando el desarrollo bacteriano) o directamente (ocasionando la muerte de la célula bacteriana). (12) impedir que crezcan y causen enfermedad. (14)
- **Póleo:**(*Mentha pulegium*) es una planta aromática llamada menta poleo, que pertenece a la especie del género *Mentha*. Conocida hace siglos en toda la cuenca del mar Mediterráneo y Asia occidental ya que crece de forma natural. (23)

2.6 Hipótesis

Hipótesis general

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) y Clorhexidina al 0,12% son eficaces en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*.

Hipótesis específico

1. El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 50% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 que a las 48 horas.

2. El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 100% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 que a las 48 horas.
3. La Clorhexidina al 0.12% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 que a las 48 horas.
4. Los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* (Muña) al 50% y 100% son más eficaces que la Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

2.8 Variables

| VARIABLE | TIPO | INDICADOR | ESCALA | VALOR |
|--------------------------|--|---|----------|--|
| Eficacia inhibitoria | Cuantitativa Numérica Variable dependiente | Diámetro del halo de inhibición | De razón | 5.1 – 17.5 mm |
| Sustancia antimicrobiana | Cualitativa Categórica Variable independiente | Concentraciones obtenidas por dilución y características organolépticas | Nominal | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> 50%. ▪ Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> 100%. ▪ Clorhexidina al 0.12% |
| Tiempo de exposición | Categórica Cualitativa Variable control | Tiempo de eficacia antibacteriana | Ordinal | <ul style="list-style-type: none"> ✓ A las 24 horas ✓ A las 48 horas |

CAPÍTULO III: DISEÑO Y MÉTODO

3.1 Tipo y nivel de investigación

El tipo de estudio es: experimental, prospectivo, analítico y longitudinal

El nivel de investigación es Explicativo.

3.2. Población y muestra

3.2.1 Población

Estuvo conformada por cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

3.2.2 Muestra

40 placas Petri con cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 29212) para que exista validez estadística.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Ante la necesidad de un laboratorio de microbiología para realizar la presente investigación, se presentó una solicitud dirigida al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Privada Norbert Wiener. (Ver anexo N°2)

3.3.1 Obtención y procesamiento de las muestras vegetales

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* se obtuvo de la empresa Essential Oils Perú, la cual cuenta con certificado de pureza. (Ver anexo N°3)

El transporte y conservación se realizó siguiendo el protocolo expedido por la empresa Essential Oils Perú. (Ver anexo N°4)

3.3.2 Obtención del control positivo

El Digluconato de Clorhexidina (PERIO-AID®) 0.12% se compró de una casa farmacéutica (Inkafarma) de la localidad.

Presentación: colutorio 150 ml.

3.3.3 Análisis microbiológico

El método que se aplicó para el análisis de la actividad antibacteriana fue el método por difusión en Agar, donde se empleó discos de papel filtros embebidos con 20uL de aceite esencial al 50%, 100% de *Minthostachys mollis* y como controles positivos se utilizó la Clorhexidina al 0.12% y como control negativo agua destilada.

3.3.4 Evaluación de la actividad antibacteriana

Para la evaluación de actividad antibacteriana con la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 29212) con las 2 sustancias antibacterianas (*Minthostachys mollis* y Clorhexidina al 0.12%) se realizó lo siguiente: la activación de la cepa bacteriana, la preparación del inóculo, inoculación (Difusión en agar).

3.3.4.1 Activación de la cepa bacteriana

Se utilizó tres placas Petri con agar Mueller-Hinton para la activación de la cepa de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 29212) por 7 días a 37°C.

3.3.4.2 Preparación de los medios de cultivo

El medio de cultivo (Mueller-Hinton) fue preparado siguiendo las indicaciones del fabricante, distribuyéndose luego en 40 placas Petri a razón de un espesor de

4mm por placa. Se dejó de reposar a temperatura ambiental y por último se rotulo con las sustancias de estudio. (Ver anexo N° 9)

3.3.4.3 Preparación del inóculo

Una vez confirmado el crecimiento de las colonias de *Porphyromonas Gingivalis*, se tomó una muestra de dichas colonias, vertiéndolas en caldo de infusión Tripticasa soya para su reactivación para luego estandarizar la densidad del inóculo, ajustándolas a una lectura de turbidez de 0.5 en la escala de Mc Farland (1.5 x 10⁸ bacterias / ml.) (Ver anexo N°9)

3.3.4.4 Inoculación

Se inocularon las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, en las 40 placas Petri (en Agar Mueller-Hinton), empleando un asa de siembra para asegurar una distribución uniforme del inóculo, posteriormente se cerró las placas y se dejó secar durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente antes de colocar los discos con las respectivas sustancias antimicrobianas. Una vez absorbido el inóculo y con la ayuda de una pinza estéril se procedió a colocar 4 discos (con las diferentes sustancias a estudiar) por cada placa. Se realizó 40 repeticiones por cada medicación para luego colocarlas dentro de la jarra de anaerobiosis con respectiva bolsa de anaerobiosis. Las placas fueron llevadas a la estufa a 37°C por el resto de la investigación, siendo únicamente retirados de la estufa para medir los halos de inhibición, generados a partir de las 24 y 48 horas. (Ver Anexo N° 9)

3.3.5 Lectura

Se realizó midiendo los halos de inhibición con el calibrador vernier o regla pie de rey sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco. Estos datos fueron plasmados en la ficha de recolección de datos. (Ver anexo N°6)

3.4 Procesamiento de datos y análisis estadísticos

Para el procesamiento de la base de datos se empleó el programa estadístico SPSS versión 21 empleando la prueba T de Student para muestras relacionadas y el programa Excel para la elaboración de gráficos.

3.5 Aspectos éticos

- Solicitud para autorización del uso del laboratorio microbiológico. (Ver anexo N°2)
- El desecho de las muestras en el presente estudio se basó en las normas dadas por el protocolo de eliminación de desechos biológicos de la oficina de material didáctico y laboratorio de la Universidad Privada Norbert Wiener. (Ver anexo N°7)

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

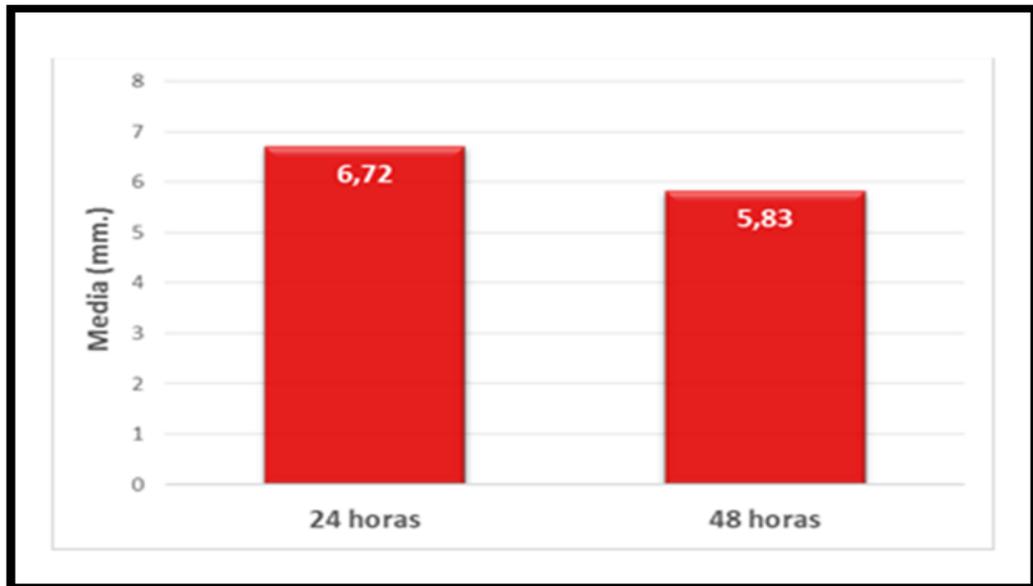
4.1. Resultado

TABLA N°1 - Grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 50% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

| Tiempo | Eficacia antimicrobiana | | p |
|----------|-------------------------|--------------------------|------|
| | Media (mm) | Desviación Estándar (mm) | |
| 24 Horas | 6,72 | 0,37 | ,012 |
| 48 Horas | 5,83 | 0,51 | |

T de Student: $p=0,012 < 0,05$ Existe diferencia estadísticamente significativa.

GRAFICO N°1 - Grado de Eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 50% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.



El grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* (Muña) al 50% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas Gingivalis* fueron los siguientes:

- A las 24 horas $6.72 \pm 0.37\text{mm}$
- A las 48 horas $5.83 \pm 0.51\text{mm}$

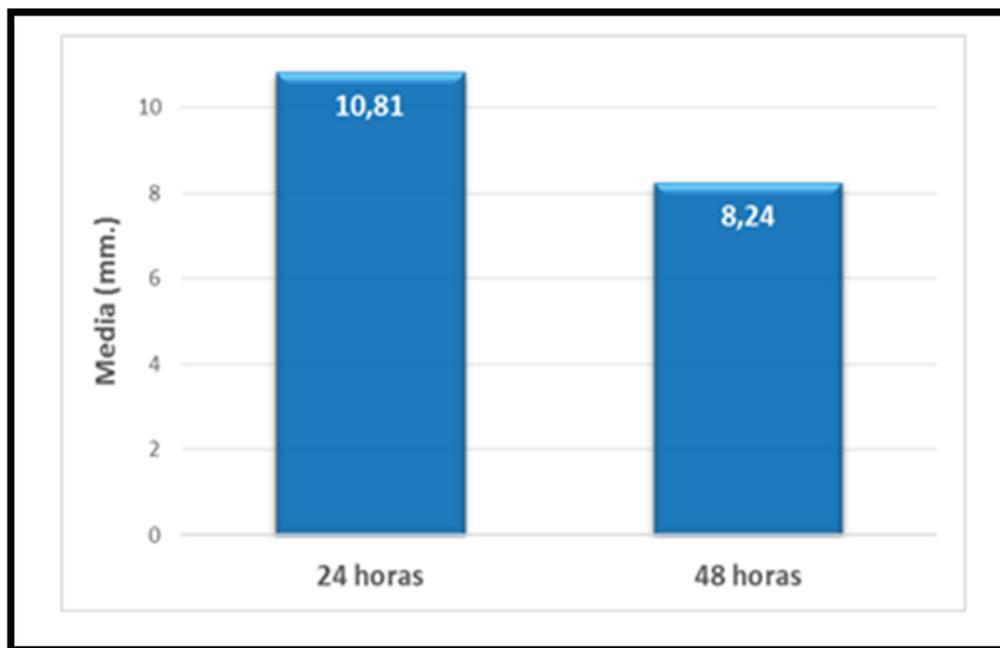
Diferencia que fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Por lo tanto, se observa una disminución en la eficacia del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* (Muña) al 50% de las 24 a las 48 horas.

TABLA N° 2 - Grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 100% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

| Tiempo | Eficacia antimicrobiana | | p |
|----------|-------------------------|--------------------------|------|
| | Media (mm) | Desviación Estándar (mm) | |
| 24 Horas | 10,81 | 0,79 | ,360 |
| 48 Horas | 8,24 | 0,75 | |

T de Student: $p=0,360 > 0,05$ No existe diferencia estadísticamente significativa.

GRAFICO N° 2 - Grado de Eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 100% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.



El grado de eficacia del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* (Muña) al 100 % en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas Gingivalis* fueron los siguientes:

- A las 24 horas $10.81 \pm 0.79\text{mm}$
- A las 48 horas $8.24 \pm 0.75\text{mm}$

Diferencia que no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Por lo tanto, se observa una disminución en la eficacia del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* (Muña) al 100% de las 24 a las 48 horas.

TABLA N°3 - Eficacia de la Clorhexidina 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

| Tiempo | Eficacia antimicrobiana | | p |
|----------|-------------------------|--------------------------|------|
| | Media (mm) | Desviación Estándar (mm) | |
| 24 Horas | 15,80 | 0,73 | ,570 |
| 48 Horas | 15,98 | 0,80 | |

T de Student: $p=0,570 > 0,05$ No existe diferencia estadísticamente significativa.

GRAFICO N°3 - Eficacia de la Clorhexidina 0,12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.



La eficacia de la Clorhexidina al 0,12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas Gingivalis* fueron los siguientes:

- A las 24 horas $15.8 \pm 0.73\text{mm}$
- A las 48 horas $15.98 \pm 0.80\text{mm}$

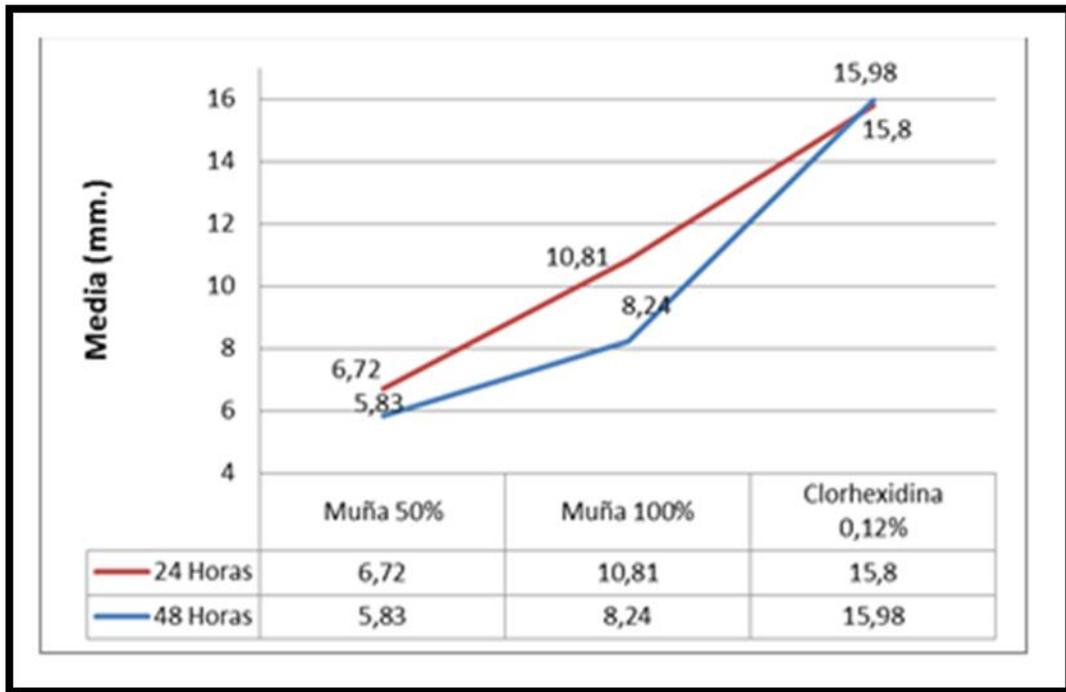
Diferencia que no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Por lo tanto, se observa un incremento en la eficacia de la Clorhexidina al 0,12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas Gingivalis* de las 24 a las 48 horas.

TABLA N° 4 - Comparar el grado de eficacia generados por el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 50%, 100% y la Clorhexidina 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

| | Tiempo | | | |
|--------------------|-------------|------------|-------------|------------|
| | 24 Horas | | 48 Horas | |
| Medicación | Media (mm.) | D.S. (mm.) | Media (mm.) | D.S. (mm.) |
| Muña 50% | 6,72 | 0,37 | 5,83 | 0,51 |
| Muña 100% | 10,81 | 0,79 | 8,24 | 0,75 |
| Clorhexidina 0,12% | 15,80 | 0,73 | 15,98 | 0,80 |

Por lo tanto se observa una disminución en la eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 50%,100 % de las 24 a las 48 horas. Mientras que la Clorhexidina al 0.12 % mostro una incremento mínimo de las 24 a las 48 horas.

GRAFICO N° 4 - Comparar el grado de eficacia generados por el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) al 50%, 100% y Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.



El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 100 % demostró mayor sensibilidad que la concentración de *Minthostachys mollis* (muña) al 50%. Sin embargo la Clorhexidina al 0.12 % demostró un rango superior de sensibilidad frente a las anteriores muestras mencionadas a las 24 y 48 horas.

4.2. Discusión

En este estudio se determinó la eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* mostrando que al 100% presentó un halo de inhibición de 8.24 mm y al 50% un halo inhibición de 5.83 mm a las 48 horas frente a *Porphyromonas gingivalis*, lo cual concuerda con el estudio de Aigaje A (2016)³⁴, quien evaluó la efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100% y 50% presentando un halo de inhibición 13.6mm y 9.6mm a las 48 horas respectivamente frente a *Porphyromonas gingivalis*. Sin embargo existieron diferencias entre las mediciones de los halos de inhibición en ambos trabajos.

Existen de igual manera, trabajos que afirman lo expuesto, sobre la eficacia de los mismos como el realizado por Huari G (2014)¹⁰, donde evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100% y 50% en *Streptococcus mutans*. Mostrando que al 100% obtuvo un promedio de 10.79 mm, mientras que al 50% fue de 7.6 mm a las 48 horas respectivamente.

En este estudio *in vitro* se determinó que el Gluconato de clorhexidina al 0.12% presento ser más eficaz que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* (en sus diferentes concentraciones) a las 24 horas que a las 48 horas, así mismo Figueroa G (2014)⁴, comprobó que el Gluconato de clorhexidina al 0.12% obtuvo mayor efecto inhibidor que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* en sus diferentes concentraciones, pero frente a otro microorganismo. Encontrando concordancia también con Carhuaricra Y (2015)², donde corrobora que el Gluconato de clorhexidina 0.12% tuvo mayor efecto inhibidor que el aceite esencial *Rosmarinus officinalis* frente a *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

Este trabajo tuvo como fin demostrar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) en sus diferentes concentraciones frente a *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y a 48 horas, sabiendo que esta es una de las bacterias patógenas dentro de las enfermedades periodontales.

CAPÍTULO V: Conclusión y Recomendación

5.1 Conclusiones

1. El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 50% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 que a las 48 horas.
2. El aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) al 100% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 que a las 48 horas.
3. El Gluconato de Clorhexidina al 0.12%, es menos eficaz en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 que a las 48 horas.
4. Los aceites esenciales de *Minthostachys mollis* (muña) al 50 %, 100 % son menos eficaces que la Clorhexidina al 0,12% en la inhibición del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis* a las 24 y 48 horas.

Recomendaciones

1. Realizar más trabajos de investigación con otros aceites esenciales frente a *Porphyromonas gingivalis*, con el motivo de encontrar una solución a los problemas periodontales.
2. Realizar trabajos de investigación donde se estudie la eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*.
3. Realizar trabajos de investigación donde se estudie la eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Tannerella forsythensis*.
4. Realizar trabajos de investigación donde se estudie la eficacia del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a *Prevotella intermedia*.
5. Crear un banco de bacterias orales dedicada a la preservación y suministro de cepas para diversos fines que permitan incitar al estudiante en campo de la investigación con el fin de resolver sus dudas y poder brindar alternativas de solución.
6. Realizar estudios sobre la eficacia del aceite esencial *Minthostachys mollis* (25% 50% y 100%) frente a *Porphyromonas gingivalis*, recolectadas de los pacientes que acuden a la clínica odontológica de la Universidad privada Norber Wiener.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carranza F, Newman M, Takei H. Periodontología clínica. 9ª ed. Madrid: Editorial McGraw Hill; 2003.
2. Ramos D, Moromi H, Martínez E. *Porphyromonas gingivalis*: patógeno predominante en la periodontitis crónica. Odontol. Sanmarquina 2011; 14(1): 34-38.
3. Carhuaricra Y. Efecto inhibitorio de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (romero) y Clorhexidina al 0.12 % sobre *Porphyromonas gingivalis*. Estudio *in vitro*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista] Universidad Norbert Wiener, Lima-Perú; 2015.
4. Calixto M. Plantas medicinales utilizadas en odontología (parte I). Kiru 2006,3 (2).
5. Malpartida F. Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (Muña) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y Gluconato de Clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*, estudio *in vitro*. Tesis para optar el grado académico de maestro en estomatología, Universidad Alas Peruanas, Lima – Perú; 2009
6. Del Rio P. Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio *in vitro*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista] Universidad de Chile, Santiago – Chile; 2006.
7. Díaz J, et al. Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. Rev. Clin Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral 2012 Vol. 5(1); 40-45.

8. Lindhe J, Karring T, Lang N. Periodontología clínica e Implantología odontológica. 4ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2005.
9. Pastor I. Eficacia in vitro del extracto de Blueberry en cepas certificadas de *Porphyromonas gingivalis* en los laboratorios clínicos de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa 2013[tesis para optar el título de cirujano dentista] Universidad Católica de Santa María, Lima-Perú; 2014.
10. Liébana J .Microbiología oral. 2^{da} ed. Madrid: McGraw Hill; 2002.
11. Moreno S, Contreras A. Factores de Virulencia DE *Porphyromonas gingivalis*. Fundación Juan José Carraro 2013; N° 37.
12. Azaña I. Efectividad Antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista] Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima-Perú; 2010.
13. Aigaje A. Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis* estudio *in vitro*. [tesis para optar el título de odontólogo] Universidad Central del Ecuador, Facultad de odontología, Quito-Ecuador; 2016.
14. Fernández K, García C. Efectividad antibacteriana in vitro de una Solución a base de camelia sinensis y *Minthostachys mollis* frente a flora Salival mixta en pacientes Ortodónticos. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista] Universidad inca Garcilaso de la vega, Lima-Perú; 2009.

15. Huari G. Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *Streptococcus mutans* [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista] Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima-Perú; 2014.
16. Rentor R, *et al.* Efectividad *in vitro* de la clindamicina gel sobre bacterias periodonto patógenas. *Oral* 2012; 13 N°43.
17. Figueroa G. Efecto inhibidor del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en comparación al Gluconato de Clorhexidina 0,12% frente a cepas del *Streptococcus mutans*. estudio *in vitro*. [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista] Universidad Norbert Wiener, Lima-Perú; 2014.
18. Rivarola M. La muña: menta de los andes. *Gener@cción*. 2008; 6(70):36-40.
19. Retto D. Efecto inhibidor del aceite esencial de *cymbopogon citratus* (hierba luisa) en comparación con la Clorhexidina 2% frente a cepas de *enterococcus faecalis*. estudio *in vitro*. [tesis para optar el título de cirujano dentista] Universidad Norbert Wiener, Lima-Perú; 2014.
20. Carhuapoma M, *et al.* Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb “Ruyaq muña”. *Ciencia e Investigación* 2009; 12(2): 83-89.
21. Borja X. Análisis comparativo del efecto antimicrobiano y antiséptico prequirúrgico de piel con barba y piel sin barba entre Yodopovidona, clorhexidina/alcohol y Clorhexidina/cetrimida en los estudiantes de la facultad de odontología de la universidad de las américas periodo 2015-2016. [Tesis para optar el grado académico de especialista en cirugía oral.] Universidad central del ecuador, Quito-Ecuador; 2016.

22. Sequeria C. Comparación entre los resultados de la aplicación in situ de una mezcla de metronidazol y gel de clorhexidina 0.20%, en el tratamiento de bolsas periodontales ≥ 6 mm y los obtenidos con el uso de colutorio de clorhexidina 0.12% en de la Clínica de Especialidades Odontológicas de ULACI. Universidad Latinoamericana de Ciencia y Tecnología, San José- costa rica; 2008.
23. Muñoz I, Alonso M, Santos M. Plantas medicinales españolas. *Menthapulegium* l. (*labiatae*). (poleo, poleo-menta) *spanish medicinal plants*. *Mentha pulegium* l. Ed.universidad de salamanca stud. Bot. 17, 1998, pp. 97-107.
24. Moreno S, Contreras A. Functional differences of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in determining periodontal disease pathogenesis: a literature review .Colombia Medical.2013; Vol. 44 N° 1.
25. Abusleme L, Blanc V, León R, Gamonal J, Silva N. Genotipificación de los genes rgpA y kgp que codifican para las gingipaínas de *Porphyromonas gingivalis*. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral 2012 Vol. 5(3); 136-139.
26. Nagihan B, Georgios B. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. Microbiol Lett 2012; 1–9.
27. Jaroslav M, et al. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. Journal of Immunology Research 2014; 8.
28. Díaz A, et al. Periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* y su relación con la expresión de quorum sensing. Revista Cubana de Estomatología 2010; 47(4)404-416.

29. Gherzi H, Inga R. Identificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de microorganismos presentes en las infecciones orofaciales odontogénicas. *Rev. Estomatol Herediana*. 2010; 20(1):5-12.
30. Bacones A, Caballero A. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis* como principal patógeno periodontal. *avances en periodoncia* 2000; 12,2: 69-75.
31. Kimura S, Yuko Ohara Y, Shimoyama Y, Ishikawa T, Sasaki M. Pathogenic Factors of *Porphyromonas gingivalis* and the Host Defense Mechanisms. *Pathogenesis and Treatment of Periodontitis* 2012; 200.
32. Casas S. Eficacia en la cicatrización del apósito con aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) versus el apósito quirúrgico convencional en Gingivectomias en *Oryctolagus cuniculus* (conejos). [Tesis para optar el título de Cirujano Dentista] Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima-Perú; 2011.
33. Bascones A. *Periodoncia clínica e implantología oral*. Madrid: ed avances 2010; N° 195.
34. Orrego M, Parra-Gil M, Salgado Y, Erika Muñoz E, Fandiño V. *Porphyromonas gingivalis* y enfermedades sistémicas. *Revista CES Odontología* 2015; Vol. 28 N°1.
35. Yapuchura R. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (kunth) griseb.) E inca muña (*clinopodium bolivianum* (benth.) Kuntze) [Tesis para optar el Grado de *Magister Scientiae en tecnología de alimentos*] Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú; 2010.

36. Renée M, Papone V, Jiménez C. Gluconato de clorhexidina: seguridad y eficacia como antiséptico en cirugía bucomáxilofacial. *Tendencias en Medicina* 2016; N° 48:113-121.
37. Caqui S. Efecto inhibitor del extracto hidroalcohólico del *Allium sativum* (ajo) a diferentes concentraciones en comparación al perio-aid® frente a cepas de *Streptococcus mutans*. estudio *in vitro*. [Tesis para optar el Título de Cirujano Dentista] Universidad Norbert Wiener, Lima-Perú; 2016.
38. Dentaïd Salubucal. Perio-Aid más que una Clorhexidina. La estrecha relación entre la salud bucal y la salud general. [Citado 2017]. N° 23. [aprox. 24 p.]
Disponible en: http://www.saludbucaldentaïd.com/uploads/magazines/15_26012017131843_54652%20Salud%20Bucal%2023.pdf.
39. Garcia R, Palou E. Mecanismo de acción antimicrobiana del timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 2008;(2)2: 41-51.

ANEXO 1
RESPUESTA A SOLICITUD PARA USO DE LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA



Lima, 28 de abril de 2016

Señor
Juan Carlos Quichca Mendoza
Bachiller
Presente.-

Es grato dirigirme a usted para saludarlo cordialmente y en referencia a su solicitud presentada sobre la realización de su proyecto de investigación titulado: "GRADO DE EFICACIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys Mollis* (MUÑA) y CLORHEXIDINA AL 0,12% EN LA INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *Porphyromonas Gingivalis*. ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO. LIMA 2016", hacemos de su conocimiento que la Dirección de la EAP de Odontología, autoriza y brinda las facilidades necesarias para que pueda realizar el levantamiento de información de su trabajo de investigación.

Es propicia la ocasión para expresarle los sentimientos de mi especial consideración.

Atentamente,



Mg. Carlos Michell Cálvez Ramírez
Director (a)
Escuela Académico Profesional de
Odonatología

ANEXO 2

SOLICITUD PARA EL USO DEL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO

Yo Quichca Mendoza Juan Carlos, alumno del 10 ciclo de la EAP de Odontología con código a2008100683, ante usted me presento y digo:

Que con la finalidad de desarrollar mi trabajo de investigación: "GRADO DE EFICACIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *MINTHOSTACHYS MOLLIS* Y CLORHEXIDINA 0.12% EN LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*" y necesitando utilizar las instalaciones del laboratorio de microbiología que usted dignamente dirige es que lo solicito me permita el ingreso y el uso del mismo.

Sin otro particular y agradecimiento anticipadamente la atención a la presente me despido de usted.

Atentamente



Quichca Mendoza Juan Carlos

Lima 19 de abril 2018

ANEXO 3

José Ricardo Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 017512863 - RPM 963689079
e-mail: joramde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, JUAN CARLOS, QUICHCA MENDOZA, con Grado Académico de Bachiller, egresado de la Escuela Académico Profesional de Odontología. Facultad De Ciencias De La Salud de la Universidad Privada Norbert Wiener. Con fines de investigación para desarrollar la tesis titulada "GRADO DE EFICACIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys Mollis* (muña) Y CLORHEXIDINA AL 0,12% EN LA INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *Porphyromonas Gingivalis*. Ha solicitado la determinación y certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de "muña", la muestra vegetal, ha sido determinada según THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX, como *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb. Y según el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist (1981) ocupa la siguiente posición taxonómica:

| | |
|----------|--|
| REINO | : Plantae |
| DIVISIÓN | : Magnoliophyta |
| CLASE | : Magnolopsida |
| SUBCLASE | : Asteridae |
| ORDEN | : Lamiales |
| FAMILIA | : Lamiaceae |
| GENERO | : <i>Minthostachys</i> |
| ESPECIE | : <i>Minthostachys mollis</i> (Kunth) Griseb |

Nombre vulgar: "muña"

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 03 de mayo del 2017



Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

ANEXO 4

CERTIFICADO DE PUREZA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis*



Mg. Sc. Carlos Michel Gálvez Ramirez
Director de la Escuela Profesional de Odontología
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Norbert Wiener

Presente.-

De nuestra consideración, reciba los saludos cordiales a nombre de Esencial Oils Perú.

Por medio de la presente tenemos a bien certificar que el producto ACEITE ESENCIAL DE MUÑA (*Minthostachys mollis*) es 100% puro, producido utilizando el método de Destilación por Arrastre de vapor.

Este certificado es emitido a solicitud de JUAN CARLOS QUICHCA MENDOZA con DNI N° 44540089 y código de alumno N° 2008100683 para su utilización en la investigación "GRADO DE EFICACIA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys Mollis* (MUÑA) Y CLORHEXIDINA AL 0,12% EN LA INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE *Porphyromonas Gingivalis*. ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO. LIMA 2016".

Atentamente,



Ing. Armando Noriega Mangini
Gerente General
Esencial Oils Perú

ANEXO Nº 5

PROTOCOLO DE TRANSPORTE Y CONSERVACION EXPEDIDO POR LA EMPRESA ESSENTIAL OILS PERU



Essential Oils Peru SAC
Calle Los Viñedos 312 - Camacho
La Molina - Lima
Telf: (051) 730 9840
ventas@eopperu.com
www.AceitesEsenciales-eop.com

Protocolo de conservación de aceites esenciales EOP

Los Aceites Esenciales (AE) EOP son 100% puros y naturales. No contienen en su constitución aditivos químicos ni conservantes. Son producidos por medio de destilación por arrastre de vapor y mantenidos en condiciones óptimas de almacenamiento pudiendo tener un tiempo de vida útil de hasta 3 años según sea el caso.

Recomendaciones de almacenamiento y conservación:

- ✓ Mantenerlos en frascos de vidrio de color oscuro, ámbar de ser posible.
- ✓ Mantenerlos con tapón y tapa para evitar la entrada constante de aire.
- ✓ Mantenerlos alejados de la luz natural y en especial de la luz ultravioleta ya que algunos compuestos son fotosensibles y pueden llegar a oxidarse.
- ✓ Se deben conservar en lugares frescos, evitando cambios bruscos de temperatura, enfriamientos y calentamientos continuos.

El tiempo de vida útil promedio es de 3 años. Sin embargo las características aromáticas se mantienen intactas por un tiempo aproximado de 1 año en la mayoría de los casos.

Observaciones:

- ✓ Los AE cítricos son más propensos a la oxidación por lo que tienen un tiempo de vida menor. Para su mejor conservación se sugiere conservarlos a temperaturas entre los 4-10°C.
- ✓ Los AE de anís, hinojo y otros de la familia *apiaceae*, tienden a solidificarse a bajas temperaturas, no implicando esto su deterioro. Para ellos, es recomendable mantenerlos a temperatura ambiente.
- ✓ Los AE de vetiver y algunos maderables tienden a cambiar de aroma con el tiempo, fenómeno conocido como maduración.

ANEXO 6

FICHA MICROBIOLÓGICA DE RECOLECCION DE DATOS

| Placa petri | Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) | | | | Clorhexidina 0.12% | | Agua destilada (Control) | |
|-------------|---|----------|----------|----------|--------------------|----------|--------------------------|----------|
| | 50% | | 100% | | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| 1 | 7.2 | 5.8 | 12.1 | 8.3 | 17.2 | 17.4 | - | - |
| 2 | 6.7 | 6.1 | 11.4 | 7.2 | 15.5 | 16.3 | - | - |
| 3 | 7.0 | 5.9 | 10.8 | 9.6 | 14.9 | 14.6 | - | - |
| 4 | 6.1 | 5.3 | 12.0 | 8.4 | 16.5 | 16.1 | - | - |
| 5 | 6.3 | 4.9 | 11.2 | 7.9 | 16.0 | 16.2 | - | - |
| 6 | 6.8 | 5.1 | 10.8 | 8.6 | 15.2 | 16.1 | - | - |
| 7 | 7.1 | 6.6 | 11.0 | 8.2 | 15.3 | 15.0 | - | - |
| 8 | 6.1 | 5.4 | 10.9 | 7.3 | 15.6 | 15.7 | - | - |
| 9 | 6.7 | 6.1 | 9.8 | 7.8 | 15.7 | 15.5 | - | - |
| 10 | 5.8 | 5.3 | 12.2 | 8.6 | 15.6 | 15.4 | - | - |
| 11 | 7.4 | 6.2 | 10.3 | 9.1 | 15.4 | 15.5 | - | - |
| 12 | 6.4 | 5.8 | 11.0 | 9.1 | 16.3 | 16.3 | - | - |
| 13 | 6.7 | 6.1 | 9.8 | 7.4 | 16.3 | 16.4 | - | - |
| 14 | 7.2 | 5.9 | 10.4 | 8.6 | 15.3 | 15.6 | - | - |
| 15 | 6.5 | 5.3 | 11.8 | 7.9 | 16.5 | 16.3 | - | - |
| 16 | 6.9 | 5.7 | 10.1 | 7.0 | 15.7 | 16.0 | - | - |
| 17 | 7.0 | 6.2 | 11.2 | 8.3 | 16.0 | 15.7 | - | - |
| 18 | 6.8 | 6.4 | 10.0 | 7.8 | 13.4 | 13.5 | - | - |
| 19 | 6.2 | 5.4 | 11.4 | 8.8 | 16.8 | 16.5 | - | - |
| 20 | 6.9 | 6.3 | 10.3 | 8.1 | 15.6 | 15.2 | - | - |
| 21 | 7.1 | 6.7 | 9.7 | 8.1 | 17.1 | 16.1 | - | - |
| 22 | 6.5 | 5.4 | 10.8 | 7.9 | 16.5 | 17.4 | - | - |
| 23 | 6.7 | 5.7 | 11.2 | 8.7 | 16.2 | 16.9 | - | - |
| 24 | 7.0 | 6.3 | 11.5 | 7.3 | 16.1 | 16.3 | - | - |
| 25 | 6.8 | 6.1 | 10.2 | 8.7 | 16.0 | 15.5 | - | - |
| 26 | 6.2 | 5.2 | 9.9 | 7.2 | 15.0 | 15.6 | - | - |
| 27 | 6.9 | 5.8 | 10.7 | 9.4 | 15.4 | 16.0 | - | - |
| 28 | 7.1 | 6.5 | 10.2 | 8.6 | 15.0 | 15.0 | - | - |
| 29 | 6.2 | 5.4 | 9.8 | 7.5 | 15.8 | 16.2 | - | - |
| 30 | 6.8 | 5.2 | 11.1 | 8.0 | 14.7 | 15.1 | - | - |
| 31 | 7.1 | 6.3 | 12.1 | 8.7 | 17.1 | 17.5 | - | - |
| 32 | 6.3 | 5.7 | 10.8 | 7.9 | 15.8 | 16.1 | - | - |
| 33 | 6.9 | 5.1 | 9.3 | 8.8 | 16.6 | 17.4 | - | - |
| 34 | 7.0 | 6.3 | 12.0 | 8.0 | 15.7 | 16.4 | - | - |
| 35 | 6.5 | 5.4 | 11.3 | 8.1 | 16.2 | 16.7 | - | - |
| 36 | 6.7 | 5.6 | 9.6 | 8.4 | 15.8 | 16.2 | - | - |
| 37 | 7.1 | 6.9 | 10.0 | 7.9 | 15.2 | 15.3 | - | - |
| 38 | 6.3 | 5.1 | 10.6 | 7.4 | 15.9 | 15.6 | - | - |
| 39 | 6.7 | 6.1 | 11.3 | 8.1 | 15.4 | 16.6 | - | - |
| 40 | 6.9 | 6.4 | 11.8 | 10.8 | 15.7 | 15.8 | - | - |

ANEXO 7

Protocolo de eliminación de desechos biológicos de la oficina de material didáctico y laboratorio de la Universidad Privada Norbert Wiener





59.6

NORMAS DE ELIMINACIÓN Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS COMUNES Y ESPECIALES.

Normas a cumplir por los usuarios de Laboratorios de ciencias y ambientes afines.

I.- CLASIFICACIÓN Y ELIMINACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS.

RESIDUOS LÍQUIDOS ESPECIALES
Líquidos orgánicos y otros: Diluir con abundante agua y eliminar directamente al desagüe.
Solventes (tolueno, éter, benceno, metanol, nitrobenzono, acetona): Colocar los solventes en los frascos rotulados correspondientes ubicados en los laboratorios para su desecho respectivo por una empresa autorizada, no mezclar los reactivos.
Líquidos infecciosos (sangre, secreciones, sobrenadantes de los cultivos: bacterias, hongos, virus, mohos): Almacenar los materiales que contengan los microorganismos anteriormente citados en un recipiente que contenga lejía o betagen R82F (4ml en 1 lt de agua) por 10 minutos y eliminar el líquido contaminado al desagüe, embalar el recipiente con cintas de seguridad y desechar.

RESIDUOS SÓLIDOS ESPECIALES
Material de vidrio roto - Triturar el vidrio hasta 10 cm. de diámetro y colocar en el recipiente habilitado para el desecho de vidrios del almacén de reactivos, asegurar con cinta de embalaje.
Material de vidrio contaminado.- Prolongar el proceso de autoclavado por una hora a 121°C y 1,5 atmósferas de presión para volver a utilizar.
Agares, caldos: Autoclavar y colocar los desechos en la bolsa roja y colocar al tachó rojo.
Sales, óxidos, hidróxidos.- las sales se pueden reciclar, separar los residuos de los óxidos e Hidróxidos, colocar en una bolsa y colocarlo en la bolsa amarilla y tachó amarillo.

RESIDUOS SÓLIDOS COMUNES
Plásticos (venoclisis, volutrol, sondas Foley y similares).- Rotular y almacenar en una bolsa de plástico para su desecho en bolsa y tachó rojo.

OBJETOS PUNZANTES Y CORTANTES
Jeringas, agujas, lancetas.- Después de su uso colocar la jeringa en una caja de seguridad tetrapack, sacar el capuchón, para su desecho independiente, asegurar la caja llena con agujas para su desecho.

MATERIAL Y TEJIDOS BIOLÓGICOS
Piezas y tejidos biológicos: Colocar las muestras en frascos de vidrio y tapa hermética ancha con formol al 40 % y después de su uso eliminar a la fosa común.
Animales menores.- Colocar el animal muerto a una bolsa verde con cal para su disposición final en la fosa común por el personal responsable.
Frascos con heces.- Agregarlos formol sal o formol al 10 % para poder hacer el examen, luego del análisis autoclavar y colocarlo en la bolsa roja y tachó rojo.
Algodones usados.- Después de su uso colocar en un recipiente que contenga lejía o betagen R82F (4 mL en L de agua) por 10 minutos, colocarlo en la bolsa roja, tachó rojo.
RESIDUOS COMUNES.- Como son las bolsas plásticas, papeles, etc colocar en una bolsa y tachó azul



II.- DISPOSICIÓN FINAL

- El personal de limpieza recoge los residuos sólidos de los pisos a las 2.30 pm y 8.30 pm, pide la llave en Secretaría de Sede y/o Oficina de Laboratorio y Material Didáctico, traslada los residuos sólidos al ambiente de bioseguridad N° S 06 ubicado en el sótano.
- La disposición de los tachos es la siguiente:
 - Lado Derecho: Residuos sólidos especiales de laboratorios.
 - Lado frontal: Reactivos orgánicos y biológicos (Cafeterías y otros).
 - Lado Izquierdo: Residuos comunes. Pasadizos, aulas y servicios higiénicosLos residuos especiales son transportados y tratados por las EPS-ERS
- El personal de mantenimiento de los pisos 1 y 2 sacará los residuos sólidos comunes al carro recolector.



VICERRECTORADO
LABORATORIO Y MATERIAL DIDÁCTICO

ANEXO 8

Matriz de consistencia para Proyecto de Tesis

| FORMULACION DEL PROBLEMA | OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION | HIPÓTESIS | VARIABLES | METODOLOGIA | POBLACION Y MUESTRA |
|---|--|--|---|---|---|
| <p>¿Cuál será el grado de eficacia del Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) y Clorhexidina al 0,12% en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> . Estudio comparativo in vitro. Lima 2016?</p> | <p>Objetivo general Evaluar el grado de Eficacia del Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) y Clorhexidina al 0,12% en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i>. Estudio comparativo in vitro. Lima 2016</p> | <p>Hipótesis general El aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (muña) y Clorhexidina al 0,12% son eficaces en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i>.</p> | <p>Variable independiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) • Clorhexidina al 0.12%. | <p>Tipo de Estudio. Experimental Prospectivo Analítico Longitudinal.</p> | <p>Población: Cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i></p> |
| | <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Determinar el grado de Eficacia del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) al 50% en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 y 48 horas. Estudio comparativo in vitro. Lima 2016 ▪ Determinar el grado de Eficacia del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) al 100% en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 y 48 horas. Estudio comparativo in vitro. Lima | <p>Hipótesis específica</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. El aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) al 50% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 que a las 48 horas. 2. El aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) al 100% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 que a las 48 horas. | <p>Variable Dependiente: Eficacia inhibitoria</p> | <p>Nivel de investigación. Explicativo</p> | <p>Muestra: 40 placas con cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i>.</p> |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|
| | <p>2016</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Determinar la Eficacia del Gluconato de Clorhexidina 0.12% en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 y 48 horas. Estudio comparativo in vitro. Lima 2016 ▪ Comparar el grado de Eficacia del aceite esencial de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) al 50%, 100% y Clorhexidina al 0.12% frente a cepas de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 y 48 horas. Estudio comparativo in vitro. Lima 2016 | <p>3. La Clorhexidina al 0.12% es más eficaz en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 que a las 48 horas.</p> <p>4. Los aceites esenciales de <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) al 50%, 100% son más eficaces que la Clorhexidina al 0.12% en la inhibición del crecimiento de <i>Porphyromonas gingivalis</i> a las 24 y 48 horas.</p> | | | |
|--|--|--|--|--|--|

ANEXO 9 (FOTOS)



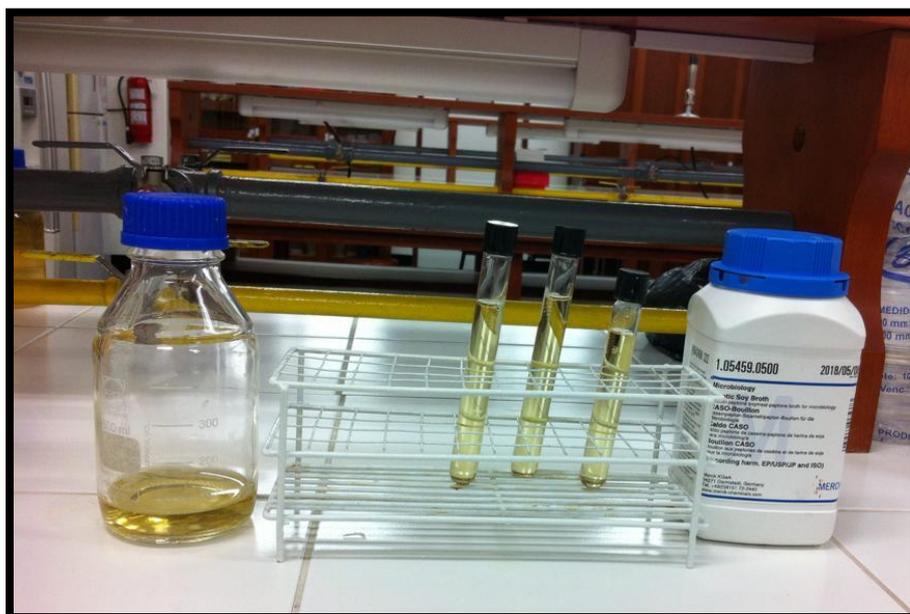
1.- Se seleccionó los materiales e instrumentos a utilizar.



2.- Se procede a la activación del ATCC 29212 (*Porphyromonas Gingivalis*) en la placa Petri, para luego ser llevado a la estufa.



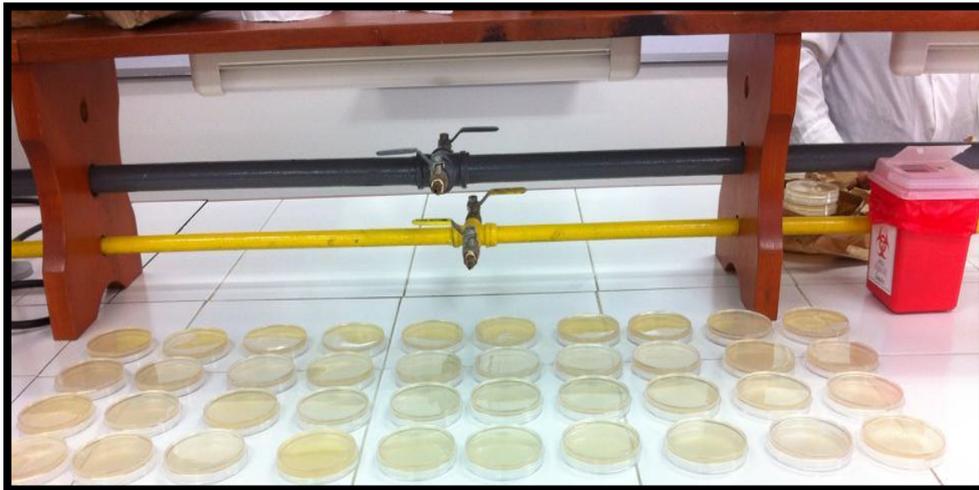
3.- Dentro de la Jarra de anaerobiosis se colocó las placas Petri sembradas con la cepa de *Porphyromonas gingivalis* y se llevó a la estufa por



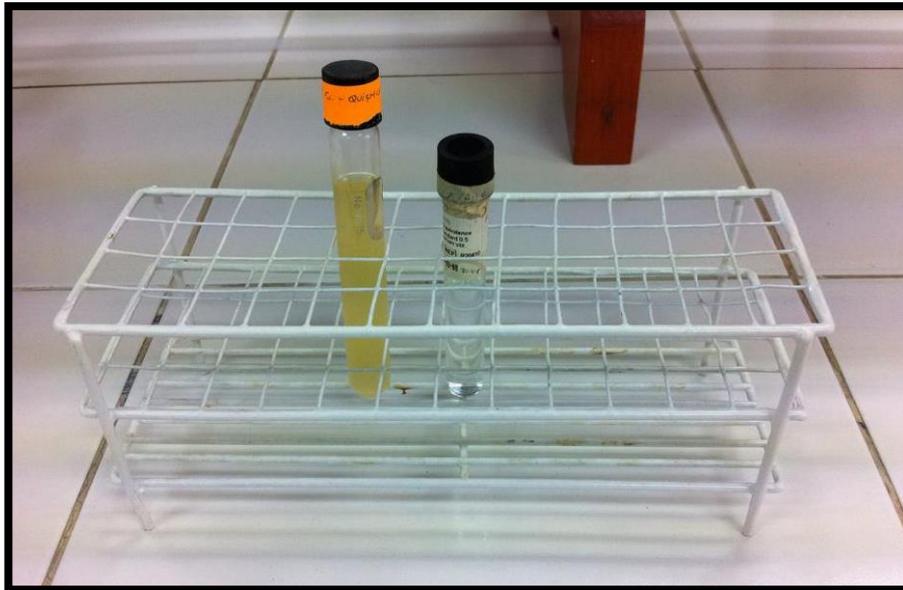
4.-Se utilizó el caldo de tripticasa de soya para reactivar las placas Petri ya activas de *Porphyromonas Gingivalis*.



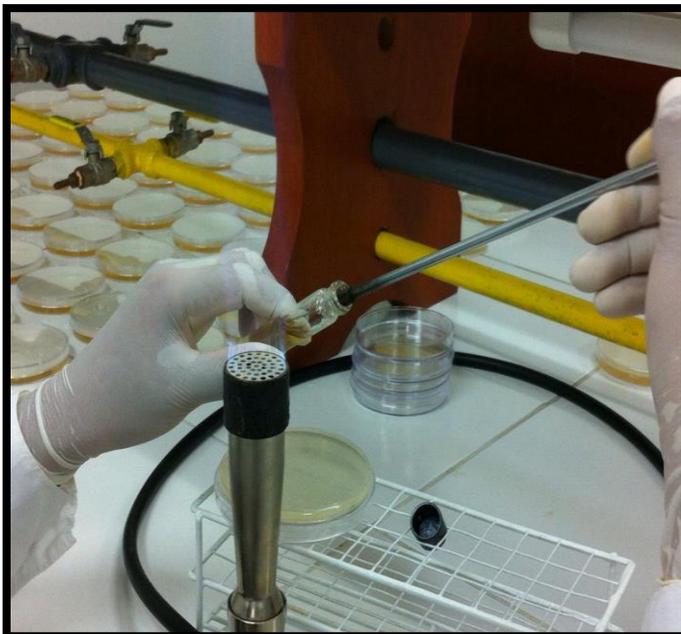
5.- Preparación del agar Muller Hinton



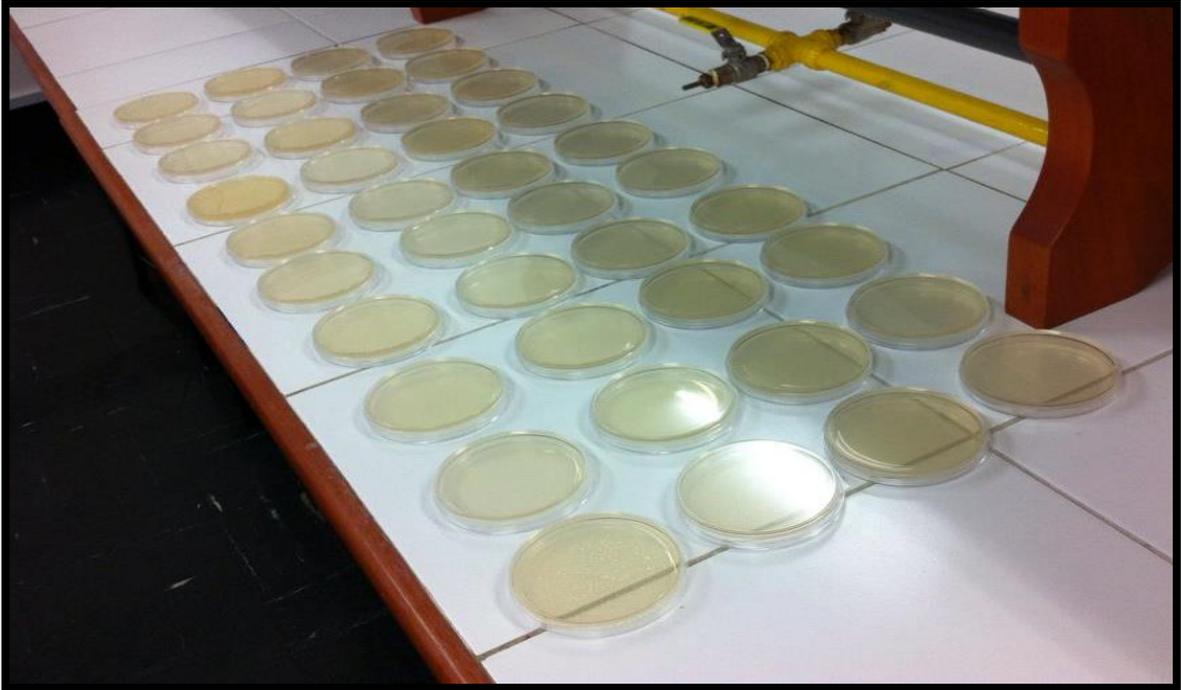
6.- Distribución del agar Muller Hinton en las 40 placas Petri



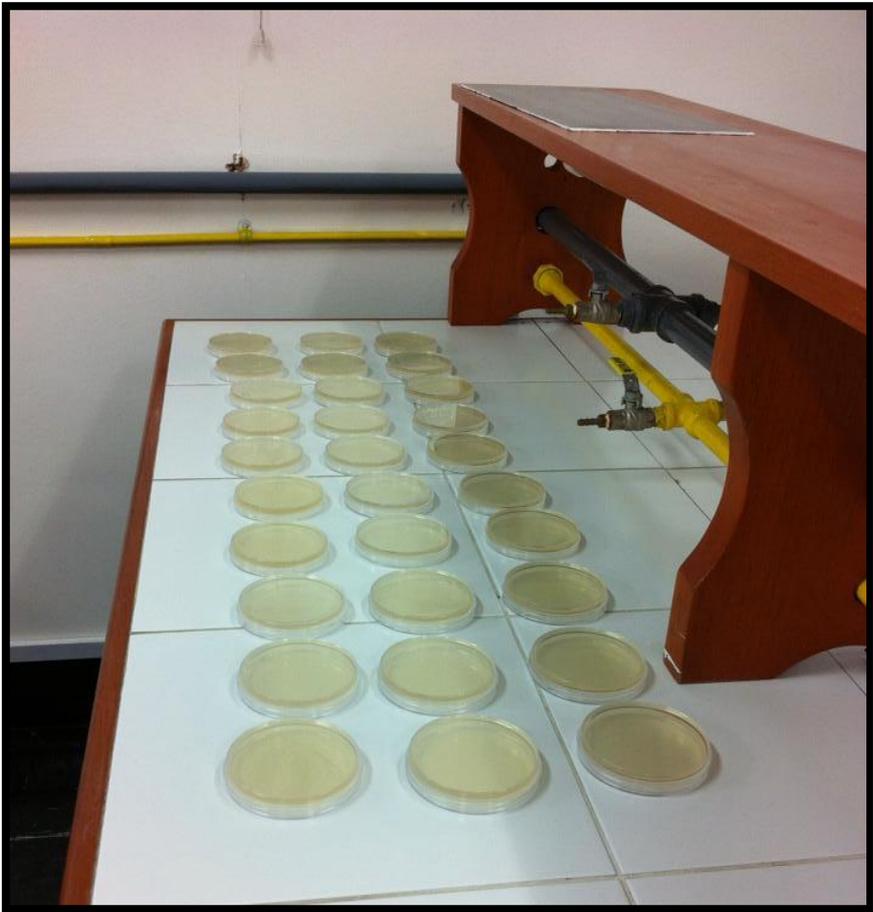
7.- Se estandarizo la densidad del inóculo con la escala de Mac Farland 0.5



8.- Se inocularon las cepas de *Porphyromonas gingivalis*, en las 40 placas Petri.



9.- Las 40 placas petri inoculadas con *Porphyromonas gingivalis*





10.-Se utilizó como sustancias antimicrobiana al aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 ,50% y Clorhexidina 0.12 %



11.- Se impregnó los discos previamente esterilizados con las sustancias antimicrobianas (20uL)



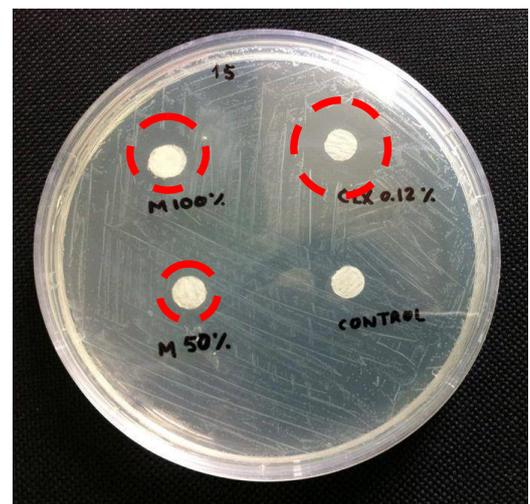
12.- Se realizó 40 repeticiones con cada sustancia antimicrobiana



13.- Se colocó dentro de las Jarra de anaerobiosis las 40 Placas petri con su respectivas bolsas de anaerobiosis.



14.- Se procedió a incubar las Jarra de anaerobiosis (con las placas Petri) a 37 °C por 24 horas.



15.- se realizó la primera lectura de los halos de inhibición de cada sustancia antimicrobiana a las 24 horas.



17.- Se procedió a colocar nuevamente las placas pétri dentro de la jarra de anaerobiosis después de la primera lectura para ser nuevamente incubadas y ser retiradas para la segunda lectura a las 48 horas.



18.- Segunda lectura de los halos de inhibición a las 48 horas.