



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA
Y BIOQUÍMICA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Schinus molle* L. “Molle”.

Tesis para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentado por:

Br.: Claudia Elizabeth Clemente Sotteccani

Br.: Rosmery Paucar Lopez

Asesor:

Dra. Juana Elvira Chávez Flores

LIMA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme en cada paso de mi vida, dándome salud y la fuerza para seguir adelante en los momentos más difíciles.

A mis padres Jesús y Asunción, por haberme brindado su comprensión y apoyo incondicional durante toda mi carrera, por sus consejos que me orientaron a tomar las mejores decisiones y por creer en mí.

A mi esposo Frank, por su paciencia y sus palabras de aliento a lo largo de mi carrera, las cuales han motivado lograr este objetivo.

A mi hija Luhana, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

Br. Claudia Clemente Sotteccani

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mis padres, Elías y Herlinda quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo momento en mi inteligencia y capacidad. Es por ello que soy lo que soy ahora. Los amo con mi vida.

A mi hermano Juan, Lucia y Maribel por lo que representan para mí y por ser parte de nuestra hermosa familia unida.

Br. Rosmery Paucar Lopez

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Privada Norbert Wiener por brindarnos todas las facilidades para el desarrollo de la tesis.

Nuestro agradecimiento y admiración a nuestra asesora Dra. Juana Elvira Chávez Flores ya que sin su tutela y guía estas páginas hubieran resultado vacías. Gracias por sus sabios consejos, por su amistad, por su entrega, por su dedicación y comprensión. Por enseñar cosas que no se encuentran en ningún libro que antes se haya escrito, ojala que el tiempo nos acerque a nuevos proyectos e ilusiones que podamos compartir.

Agradecemos a los docentes de la Universidad en especial a la Dra. Zoila Guillen y Dra. Teresa Gallardo Jugo por dedicar su tiempo siempre dispuestos a apoyarnos, gracias por sus enseñanzas.

A nuestro jurado por dedicarnos su espacio de tiempo para corregir nuestra investigación.

Al laboratorio de material didáctico por el apoyo brindado en facilitarnos los materiales y equipos ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todas las personas que colaboraron de una u otra manera para la culminación de este trabajo de tesis nuestro más profundo agradecimiento.

A los miembros del jurado.

Presidenta : Mg. Gallardo Jugo Teresa Celina

Secretaria : Mg. Peña Suasnabar Carmen Gladys

Vocal 1 : Mg. Villanueva Vílchez Hugo

Suplente : Q.F. Ramos Jaco Antonio Guillermo

Por su valiosas sugerencias y recomendaciones en la elaboración final del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

Pág.

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del Problema	2
1.2 Justificación de la Investigación	2
1.3 Objetivos	3
1.3.1 Objetivo General	3
1.3.2 Objetivos Específicos	3
1.4 Hipótesis	3
1.5 Variables	3
1.5.1 Variable dependiente	3
1.5.1 Variable independiente	3
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. ANTECEDENTES	4
2.1.1. Antecedentes nacionales	4
2.1.2. Antecedentes internacionales	5
2.2. GENERALIDADES	7
2.2.0. <i>Schinus molle</i> L. “Molle”	7
2.2.1. Origen y extensión	7

2.2.2. Características morfológicas	8
2.2.3. Hábitat	9
2.2.4. Aspectos fisiológicos	9
2.2.5. Cultivo	9
2.2.6. Tolerancias	10
2.2.7. Susceptibilidad	10
2.2.8. Análisis fitoquímico	10
2.2.9. Utilidades del <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	10
2.3. ESTUDIO QUÍMICO	12
2.3.1. Flavonoides	12
2.3.2. Distribución	12
2.3.3. Estructura, clasificación y síntesis	13
2.3.4. Flavonas y flavonoles	15
2.3.5 Propiedades de los flavonoides	16
2.3.6. Utilización de los flavonoides en terapéutica	17
2.4. EXTRACTO VEGETAL	18
2.4.1. Consistencia de los extractos	18
2.4.1.1. Extractos blandos	18
2.4.1.2. Extracto firme	18
2.4.1.3. Extracto seco	18
2.4.1.4. Extracto fluido	19

2.4.2. Características de los extractos	19
2.4.3. Conservación de los extractos	20
2.5. <i>Streptococcus mutans</i>	21
2.5.1. Medios de cultivo para <i>Streptococcus mutans</i>	21
2.5.2. <i>Streptococcus mutans</i> como iniciador de caries dental	22
2.5.3. Adquisición del <i>Streptococcus mutans</i>	22
2.5.4. Factores de virulencia del <i>Streptococcus mutans</i>	23
2.6. GLUCONATO DE CLORHEXIDINA	23
2.6.1. Historia	23
2.6.2. Características	24
2.6.3. Mecanismos de acción	26
2.6.4. Espectro de acción	26
2.6.5. Farmacocinética	26
2.6.6. Concentración	27
2.6.7. Indicaciones	27
2.6.7.1. Aplicaciones	27
2.6.8. Efectos adversos	28
III. PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1. MATERIALES	29
3.1.1. Lugar de ejecución.	29
3.1.2. Material vegetal.	29

3.1.3. Materiales para la elaboración del extracto.	29
3.1.4. Materiales para el análisis de los metabolitos secundarios.	29
3.1.5. Solventes	30
3.1.6. Reactivos.	30
3.1.7. Material y equipos para la preparación de medios de cultivo.	31
3.1.8. Otros (Gluconato de clorhexidina al 0,12%)	31
3.2. MÉTODO	32
3.2.1. Tipo de investigación	32
3.2.2. Muestra	32
3.3. METODOLOGIA Y PROCEDIMIENTO	33
3.3.1. Recoleccion, tratamiento y obtencion de las hojas de la especie de <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	33
3.3.1.1. Recoleccion de la muestra vegetal	33
3.3.1.2. Preparacion del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	34
3.3.2. Análisis cualitativo de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	38
3.3.2.1. Prueba de solubilidad	38
3.3.2.2. Análisis cualitativo	38
3.3.3. Estudio Microbiológico	40
3.3.3.1. Actividad antimicrobiana	40
3.3.3.1.1. Obtención de los microorganismos.	40
3.3.3.1.2. Preparación del medio de cultivo	40

3.3.3.1.3. Inoculación bacteriana.	42
3.3.3.1.4. Discos de sensibilidad	44
3.3.3.1.5. Preparación de las sustancias en estudio.	45
3.3.3.1.6. Inoculación de las sustancias en estudio.	46
IV. RESULTADOS	50
4.1. Prueba de solubilidad	50
4.2. Análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de <i>schinus molle</i> L."molle"	52
4.3. Actividad microbiana	56
4.3.1. Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano	56
4.4. Técnicas para el procesamiento de datos y análisis de resultados	59
4.5. Análisis e interpretación de resultados	59
4.5.1. Datos estadísticos	60
4.5.1.1. Media de halos de inhibición a las 48 horas	61
4.5.1.2. Media de halos de inhibición a las 72 horas	62
4.5.1.3. Grado de sensibilidad según Duraffourd a las 48 y 72 horas.	63
4.5.2. Análisis de datos	64
V. DISCUSIÓN	65
VI. CONCLUSIÓN	68
VII. RECOMENDACIÓN	69
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	70
IX. ANEXOS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Árbol de <i>Schinus molle</i> L. "Molle".	8
Figura 2. Estructura química de flavonoide con numeración y especificación de cada heterocíclico.	13
Figura 3. Clasificación de los flavonoides.	14
Figura 4. Estructura química de Clorhexidina	25
Figura 5. Recoleccion de la especie vegetal <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	33
Figura 6. Lavado y deshojado de la especie <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	34
Figura 7. Licuado de las hojas de la especie <i>Schinus molle</i> L. "Molle".	35
Figura 8. Maceración (1) y filtración (2) del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle".	35
Figura 9. Extracto etanólico de las hojas de la especie de <i>Schinus molle</i> L. "Molle".	36
Figura 10. Análisis cualitativo y prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L."Molle".	37
Figura 11. Sangre de ovino desfibrinada controlada.	40
Figura 12. Medios de cultivo Agar sangre.	41
Figura 13. Cepa de <i>Streptococcus mutans</i> comparada a la escala de Mac Farland al N° 0,5 (ATCC® 25175)	42
Figura 14. Inoculación de placas petri con <i>Streptococcus mutans</i> .	43
Figura 15. Discos de papel filtro WATMAN N°10	44
Figura 16. Diluciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle" al 500 y 1000 mg/mL agua destilada y gluconato de clorhexidina al 0,12%.	45
Figura 17. Inoculación de los discos de papel filtro embebidos de la sustancia de estudio en placas petri.	46

Figura 18. Material limpio y estéril para la realización del estudio antimicrobiano.	47
Figura 19. Discos de papel filtro embebidos con las sustancias de estudio.	48
Figura 20. Colocación de los discos de papel filtro embebidos de la sustancia de estudio	48
Figura 21. Incubación de las placas petri en jarra anaerobia a 37°C.	49
Figura 22. Estufa de laboratorio a 37°C.	49
Figura 23. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	51
Figura 24. Reconocimiento de flavonoides del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	53
Figura 25. Reconocimiento de alcaloides del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle".	54
Figura 26. Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle"	55
Figura 27. Medición de los halos de inhibición con el instrumento vernier "Caliper".	56
Figura 28. Halos de inhibición de gluconato de clorhexidina al 0,12%, extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L. "Molle" al 500 y 1000 mg/mL y agua destilada. A las 48 horas de exposición.	57
Figura 29. Halos de inhibición de gluconato de clorhexidina al 0,12%, extracto etanólico de <i>Schinus molle</i> L. "Molle" al 500 y 1000 mg/mL agua destilada. A las 72 horas de exposición.	58
Figura 30. Media de halos de inhibición a las 48 horas	61
Figura 31. Media de halos de inhibición a las 72 horas	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Reactivos utilizados en el análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle".	39
Tabla 2. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle" (20mg del extracto de hojas /1mL del solvente).	50
Tabla 3. Análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de <i>Schinus molle</i> L. "Molle" (20mg del extracto de hojas /1mL del solvente).	52
Tabla 4. Datos estadísticos de los halos de inhibición de gluconato de clorhexidina 0,12%, extracto etanolico de las hojas de <i>Schinus molle</i> . L "Molle" a concentraciones del 500 y 1000 mg/mL; y agua destilada en 48 y 72 horas	60
Tabla 5. Grado de sensibilidad según pautas de Duraffourd	63
Tabla 6. Pruebas de normalidad Kolmogorov - Smirnov y Shapiro - Wilk de las muestras en estudio obtenido de SPSS® version 22	64

GLOSARIO

AlCl₃:	Tricloruro de aluminio
ATCC:	American Type Culture Collection
Bz:	Benceno
CHCl₃:	Cloroformo
EtOH :	Etanol
EtOAc:	Acetato de etilo
Et₂O:	Éter etílico
EP :	Éter petróleo
FeCl₃:	Tricloruro férrico
H₂O:	Agua
Ha:	Hipótesis alternativa
Ho:	Hipótesis nula
mm :	Milímetro
MeOH:	Metanol
Q.P:	Químicamente puro

RESUMEN

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, muchas de sus especies vegetales pueden ser aprovechadas de forma sostenible por la industria, una clara alternativa es el *Schinus molle* L. "Molle", un árbol nativo con aplicaciones medicinales, cuyo extracto etanólico presenta propiedades antibacterianas. La presente investigación tuvo como objetivo comprobar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle". Para ello se procedió a obtener el extracto etanólico a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL, el gluconato de clorhexidina 0,12 % como control positivo y agua destilada como control negativo. Se realizó el estudio de la actividad antimicrobiana con el método de difusión en disco utilizando la técnica de siembra en superficie, con las soluciones experimentales en condiciones de anaerobiosis por 48 y 72 horas a 37°C, para luego proceder a la lectura de diámetros de halo de inhibición con un vernier. Mediante el análisis cualitativo se determinó la presencia de metabolitos: flavonoides, alcaloides, carbohidrato, esteroides y/o triterpenos, azúcar reductores y compuestos fenólicos. Los resultados se analizaron mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento. El extracto etanólico a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL, demostró tener actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* "ATCC 25175" y de la comparación realizada, el gluconato de clorhexidina produjo mayor inhibición. Se concluye que el extracto etanólico de *Schinus molle* L. "Molle" presenta actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* "ATCC 25175" y el gluconato de clorhexidina es cualitativamente similar al extracto etanólico de *Schinus molle* L. "Molle".

Palabras clave: Extracto etanólico, *Streptococcus mutans*, *Schinus molle* L. Actividad antimicrobiana, Gluconato de Clorhexidina.

SUMMARY

Peru is one of the most biodiverse countries in the world. Many of its plant species can be harvested in a sustainable manner by the industry. A clear alternative is the *Schinus molle* L. "Molle", a native tree with medicinal applications. Ethanolic extract has antibacterial properties. The present investigation had as objective to verify the antimicrobial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Schinus molle* L. "Molle". The ethanolic extract was obtained at concentrations of 500 and 1000 mg / mL, chlorhexidine gluconate 0.12% as positive control and distilled water as negative control. The study of the antimicrobial activity with the disc diffusion method was carried out using the technique of surface sowing, with the experimental solutions under conditions of anaerobiosis for 48 and 72 hours at 37°C, to proceed to the reading of halo diameters of inhibition with a vernier. Qualitative analysis determined the presence of metabolites flavonoids, alkaloids, carbohydrate, steroids and / or triterpenes, reducing sugars and phenolic compounds. The results were analyzed by percentage growth inhibition. The ethanolic extract at concentrations of 500 and 1000 mg / mL, showed antimicrobial activity on *Streptococcus mutans* "ATCC 25175" and from the comparison, chlorhexidine gluconate produced greater inhibition. It is concluded that the ethanolic extract of *Schinus molle* L. "Molle" shows antimicrobial activity on *Streptococcus mutans* "ATCC 25175" and chlorhexidine gluconate is qualitatively similar to the ethanolic extract of *Schinus molle* L. "Molle".

Key words: Ethanolic extract, *Streptococcus mutans*, *Schinus molle* L. Antimicrobial activity, Chlorhexidine gluconate.

I. INTRODUCCION

La medicina tradicional tiene importancia por sus grandes aportes a la medicina moderna, los pobladores dan solución a muchos de los problemas de subsistencia y conservación de la salud física y mental, aplicando conocimientos adquiridos de sus antepasados acerca de las plantas con actividad terapéutica. La abundancia y gran diversidad de estas plantas en forma silvestre y su fácil comercialización por los bajos costos que tienen, posibilitan su adquisición por las personas más necesitadas y para sustituir a los medicamentos de síntesis de altos costos.¹

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, muchas de sus especies vegetales pueden ser aprovechadas de forma sostenible por la industria, una clara alternativa es el *Schinus molle* L. "Molle", un árbol nativo con aplicaciones medicinales, cuyo extracto etanólico presenta propiedades antibacterianas.²

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios.³

Se ha demostrado que extractos de plantas o frutos pueden mejorar síntomas de la caries dental e inhibir el crecimiento de los patógenos en la placa dental con menos toxicidad.⁴ Uno de los métodos preventivos del control de patologías dentales está dirigido al control de la formación de la placa dental, para así lograr reducir la presencia del agente patógeno, por lo que se está realizando estudios sobre sustancias naturales que posean propiedades farmacológicas antibacterianas.⁵

La finalidad en la presente investigación es comprobar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle", contribuyendo a que se tenga como referencia para otros proyectos en el campo farmacológico y el uso adecuado de plantas medicinales.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Qué metabolito será el responsable de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”?

1.2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las enfermedades bucodentales, como la caries dental, la periodontitis (enfermedad gingival) y los cánceres de la boca y la faringe son un problema de salud de alcance mundial que afecta a los países industrializados y, cada vez con mayor frecuencia, a los países en desarrollo, en especial entre las comunidades más pobres.⁶

Con el presente estudio se demostrará que existen productos alternativos como es el extracto etanólico de *Schinus molle* L. “Molle” para la prevención de caries dental, en la cual el microorganismo que predomina es *Streptococcus mutans*.

El estudio tiene importancia teórica y social ya que aportará al conocimiento científico sobre la existencia de plantas medicinales con propiedades antibacterianas y, las cuales podrían ser alternativas de prevención y tratamiento de las patologías más frecuentes de la cavidad bucal, como la caries dental, de esta manera elaborar fármacos naturales, los que en su composición contengan compuestos químicos del *Schinus molle* L. “Molle”, generando así una variedad de productos de uso farmacéutico de origen natural propios de nuestra biodiversidad, los cuales tengan actividad antibacteriana sobre cultivo de *Streptococcus mutans*, permitiendo que las poblaciones de bajos recursos económicos puedan acceder a un menor costo alternativas de tratamiento para el control de microorganismos relacionados con la caries dental, como son los colutorios a base de extractos y aceites esenciales.

1.3. OBJETIVOS:

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Comprobar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle"

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Comprobar cualitativamente los metabolitos presentes en las hojas del extracto etanólico de *Schinus molle* L. "Molle", realizando reacciones de coloración y precipitación.
2. Determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle" en comparación con el gluconato de clorhexidina al 0,12 %.

1.4. HIPÓTESIS:

El metabolito responsable de la actividad antimicrobiana es el flavonoide presente en el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle".

1.5. VARIABLES:

1.5.1. VARIABLE INDEPENDIENTE

- Extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle"

1.5.2. VARIABLE DEPENDIENTE

- Actividad antimicrobiana

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES:

Los conocimientos de las plantas medicinales existentes en nuestro país son muy antiguos, muchas especies del género *Schinus* de la familia Anacardiaceae han sido usadas en la medicina tradicional como cicatrizante, analgésico, antiespasmódico, antibacteriano, insecticida, etc. En la presente investigación destacamos la propiedad antibacteriana del *Schinus molle* L. basados en estudios realizados en otros países en donde se demuestra la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle".⁷

2.1.1. ANTECEDENTES NACIONALES:

Herrera N. en el año 2013,⁸ en Trujillo, su **objetivo** fue determinar el efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. "Molle" sobre la viabilidad de *Streptococcus β-hemolítico* "in vitro". Se trabajó con cuatro concentraciones distintas (250, 500, 750 y 1000 mg/mL) de extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. y penicilina como control de inhibición. Para evaluar el efecto del extracto sobre el microorganismo se utilizó el **método** Kirby Bauer modificado, sembrándose un inóculo estandarizado con el patrón de turbiedad de 0,5 del Nefelómetro de Mc Farland en placas con Agar Mueller Hinton por técnica de siembra en superficie. Los **resultados** fueron expresados en diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *Streptococcus β-hemolítico*, encontrándose que las concentraciones empleadas afectan la viabilidad "in vitro" de este microorganismo. Su **conclusión** fue a medida que aumentan las concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. En el rango de 250 a 1000 mg/mL aumenta el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Streptococcus β-hemolítico*.

Centurión K. en el año 2015,⁹ en Trujillo, su **objetivo** fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Se realizó con el **método** sembrada en placas con medio Muller Hinton enriquecido, distribuidas en 4 grupos de 4 placas petri cada uno, en cada placa se colocó el porcentaje de concentración de estudio, frente a tres controles: control positivo (Clorhexidina al 0,12%), control negativo (Etanol) y un porcentaje de concentración similar (para comparación). Los **resultados** mostraron que la concentración al 30% del extracto etanólico de *Caesalpinia* mostró el mayor halo de inhibición (34.5 mm) y concentración mínima inhibitoria. Se **concluyó** que el extracto etanólico de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) posee efecto antibacteriano *in vitro* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

2.1.2. ANTECEDENTES INTERNACIONALES:

Rivadeneira D. en el año 2015,¹⁰ en Ecuador, su **objetivo** fue evaluar el potencial biosida “in vitro” que posee el aceite esencial de *Schinus molle* L. frente al Gluconato de clorexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans*, el estudio se realizó con el **método** de difusión en disco, para determinar la sensibilidad bacteriana a través de halos de inhibición, tanto a las 24 y 72 horas de exposición, para lo cual se utilizaron concentraciones del 100%, 50% y residuo de hidrodestilado del aceite de *Schinus molle*, además de utilizar el gluconato de clorhexidina como control positivo, agua destilada como control negativo, y comparar a su vez el efecto antimicrobiano de dichas sustancias naturales con el gluconato de clorhexidina al 0.12%. Los **resultados** mostraron que todas las concentraciones utilizadas además del residuo del aceite de *Schinus molle*, provocaron efecto antimicrobiano frente a la cepa de *Streptococcus mutans*, y de la comparación realizada, el gluconato de clorhexidina produjo mayor inhibición, pero disminuyó parcialmente su efecto a las 72horas, mientras que las concentraciones al 100% y 50% potencializaron su efecto en un 0.8% a las 72horas. Se **concluye** que existe un efecto inhibidor positivo de alto rango por el aceite

esencial de *Schinus molle* L. (Molle) frente a cepas de *Streptococcus mutans*, y el gluconato de clorhexidina es cualitativamente similar al aceite esencial de *Schinus molle*.

Rueda M. en el año 2015,¹¹ en Ecuador, su **objetivo** fue evaluar la actividad antibacteriana sobre el *Streptococcus Mutans*, del extracto de propóleo ecuatoriano frente al gluconato de clorhexidina. **Método** el estudio fue experimental in vitro, se utilizó una cepa de “*Streptococcus Mutans*”; ATCC 25175; que se sembró en cajas petri con agar sangre; sobre la cual se colocó discos de papel filtro impregnados con extracto acuoso de propóleo ecuatoriano al 30 %, extracto acuoso de propóleo ecuatoriano al 50 % y gluconato de clorhexidina al 2 %. **Resultados** se realizó la lectura de los halos de inhibición formados alrededor de cada disco trascurridas las 48 horas, en el cual se evidencio mayor inhibición para el Gluconato de Clorhexidina que para los extractos Acuosos de propóleo Ecuatoriano al 30% y al 50%; no descartando así el efecto antibacteriano de los extractos acuoso de propóleo. Se concluye que el efecto antibacteriano sobre el “*Streptococcus Mutans*” fue mayor para el Gluconato de Clorhexidina al 2% en relación al extracto acuoso de propóleo Ecuatoriano, a las concentraciones del 30 % y 50 %, destacando la presencia de actividad antibacteriana también para los extractos acuosos de propóleo Ecuatoriano en menor medida.

2.2. GENERALIDADES

2.2.0. *Schinus molle* L. “Molle”

2.2.1. Origen y extensión

El molle es originario de la región andina de Sudamérica, principalmente Perú, aunque se extiende a Ecuador, Chile y Bolivia. Y ampliamente distribuido en México, Centroamérica, el sur de California y oeste de Texas (Estados Unidos); además, se ha aclimatado bien en países tropicales y subtropicales de los cinco continentes.¹²

2.2.2. Características morfológicas

Es un árbol que crece espontáneamente en muchos lugares de América y en el Perú. La talla y grosor de este árbol varía, es de poca copiosidad, sus ramas son numerosas y quebradas, relativamente delgadas.

La corteza es agrietada, hojas imparipinnadas, alternas, angostas de bordes dentados; cortamente pecioladas, coriáceas aovadas, oblongas con nervadura principal muy marcada, prominente en ambas caras, compuestas de 15 - 30 folíolos, frescas tienen un color verde claro, sabor amargo y picante. Presenta panículas de pequeñas flores verdosas, actinomorfas, pentámeras de carpelos libres o concreciones siempre unilobuladas.¹³

Los frutos son pequeñas drupas de tamaño menor al de una arveja de 0,5 cm de diámetro, de color rojizo, olor aromático y sabor dulce, razón por la cual se usa en la elaboración de la chicha de molle. Las flores pequeñas aparecen en panículas, las semillas que forman el fruto son pequeñas, de superficie arrugada y aspecto característico.¹⁴



Figura 1. Árbol de *Schinus molle* L. “Molle”

2.2.3. Hábitat

Prospera en forma natural a orilla de caminos, en zonas con vegetación secundaria, en pedregales y lomeríos. Terrenos agrícolas y pendientes (20 a 40 %). Se desarrolla muy bien en clima entre subtropical, cálido-templado, semiárido, templado seco y templado húmedo. No tiene exigencias en cuanto a suelo, pero prefiere suelos arenosos, tolera texturas pesadas, suelos muy compactados y pedregosos.

Es capaz de desarrollarse en zonas ecológicas del tipo árida y semiárida.¹⁵

2.2.4. Aspectos Fisiológicos

Es una especie de fácil adaptación, alta sobrevivencia y con buena capacidad competitiva ya que captura nutrientes, agua y luz eficientemente. Presenta crecimiento rápido cuando es joven, alcanzando 3 m de altura en un año; y puede vivir alrededor de cien años. Su descomposición foliar es lenta y moderadamente lenta en madera y frutos, es buen productor de abono verde (mantillo). Presenta alelopatía, inhibiendo el crecimiento y/o desarrollo de plantas vecinas.¹⁵

2.2.5. Cultivo

El árbol tolera bien la poda, se aconseja practicar poda de formación en árboles jóvenes y poda sanitaria en adultos. Conviene cortar la corteza en primavera para promover su crecimiento. El riego es importante en las primeras etapas. No requiere fertilización.

La siembra debe hacerse en sustratos permeables para que las sustancias inhibitorias de la germinación se lixivien. Las semillas remojadas por varios días, se siembran en almácigos y luego se trasplantan con raíz a envases. En tierra, se planta a una distancia mínima de 8 m entre cada árbol, en lugares con suficiente espacio y luz, lejos de construcciones e instalaciones subterráneas.¹⁵

2.2.6. Tolerancias

Es una planta muy resistente a la sequía y al daño por termitas. Soporta también la inundación periódica o permanente, resiste el rocío salino, la contaminación ambiental y la exposición constante al viento. Aunque es una especie demandante de luz, tolera la semi - sombra pero no el sombreado total. Tolerancia los suelos compactados y pedregosos (texturas pesadas), los suelos pobres, los suelos ácidos, los suelos yesosos, también los suelos con metales pesados, los suelos calizos y los alcalinos.¹⁵

2.2.7. Susceptibilidad

La planta es sensible a las heladas prolongadas, al daño por insectos, a la escama de la cochinilla cerosa "*Ceroplastes sp.*", y a las orugas de la palomilla "*Rothschildia orizabae*" que ocasionan defoliaciones, aunque su daño no es importante.¹⁶

2.2.8. Análisis fitoquímicos

Metabolitos Secundarios: El análisis fitoquímico de *Schinus molle* L. "molle" indica que contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidales, esteroides, terpenos y aceite esencial.¹⁷

2.2.9. Utilidades

Uso Etnomedicinal: Los indígenas usaban su resina, corteza, hojas y fruto en infusión, cocimiento, polvos y emplastos; como antiinflamatorio, antirreumático, depurativo, astringente, catártico, hemostático, antibacteriano.

Otros Usos Populares:

- a) **Base para chicle.** Su resina blanquecina (exudado) es usada en América del Sur como goma de mascar, se dice que fortalece las encías y sana las úlceras de la boca.

- b) Combustible.** La madera se usa como leña y carbón debido a que son buenos combustibles.
- c) Colorante.** El cocimiento de hojas, ramas, corteza y raíz se emplea como colorante para el teñido amarillo pálido de tejidos de lana.
- d) Comestible.** En México se prepara una bebida refrescante con los frutos del molle, el “tolonze” que es un fermentado con pulque (bebida alcohólica), también se elabora el atole (bebida tradicional).
- e) Condimento.** Los frutos secos se han empleado en algunos países como sustituto de la pimienta negra por su sabor semejante.
- f) Cosmético e higiene personal.** De las hojas se extrae un aceite aromatizante que se usa en enjuagues bucales y como dentífrico. Las semillas también contienen aceites, de los cuales se obtiene un fijador que se emplea en la elaboración de perfumes, lociones, talcos y desodorantes.
- g) Curtiente.** Se extraen pigmentos de la corteza para teñir pieles y lana.
- h) Forrajero.** El fruto es un importante alimento para los pájaros.
- i) Implementos de trabajo.** La madera se usa para fabricar mangos de herramientas, estacas, enseres rurales y fustes de sillas de montar.
- j) Industrializable.** El exudado (resina) se podría utilizar en la fabricación de barnices y su ceniza rica en potasa se le usa como blanqueador de ropa; así mismo, en la purificación del azúcar.
- k) Insecticida.** Algunos pobladores rurales de Etiopía adornan sus cabezas con ramas y hojas del molle para repeler las moscas caseras, incluso, las hojas son desplegadas en las mesas a la hora de comer y ocasionalmente en los mataderos y áreas de procesamiento de carne.¹⁸

2.3. ESTUDIO QUIMICO

2.3.1. Flavonoides

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo, como la miel o del oro; y flavonoide, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo, azul de las plantas y frutas. Por ende se encuentran en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos; además de ser parte del árbol ginkgo biloba y la *Camellia sinensis* (té verde). Siendo que al consumirlos obtengamos de ellos propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. De esta última, principalmente, radica su función en el sistema nervioso, pues se ha visto relación de protección en enfermedades neurodegenerativas.¹⁹

2.3.2. Distribución

Se encuentran ampliamente distribuidos entre los vegetales superiores y prácticamente en todas las plantas superiores, sobre todo en partes aéreas hojas, flores y frutos. Algunos flavonoides son responsables del color amarillo.

Los pigmentos flavonicos son los más extendidos en el reino vegetal aunque son menos frecuentes en plantas inferiores. Son particularmente abundantes en ciertas familias *poligonaceae*, *rutácea*, *fabácea*, *umbeliferae*, *compositae*. Los flavonoides se suelen encontrarse en órganos aéreos y jóvenes como los botones florales y las hojas donde se localiza en los tejidos superficiales (epidermis).

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, tanto en forma de heterosidos (O - heterosidos, más frecuente, o C-heterosidos) como de geninas libres. Su presencia organográfica se detecta, sobre todo en las flores, frutos y hojas, mientras que sus bioprecusores son más frecuentes en otros órganos del vegetal.²⁰

2.3.3. Estructura, clasificación y síntesis

Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos (A y B), ligados mediante un anillo pirano (C). Lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 (figura 2), común en la mayoría de los flavonoides. Y gracias a las variaciones del pirano se logran clasificar 4 como se muestra en el cuadro (figura 3). La síntesis de los flavonoides tiene lugar en las plantas a partir de unidades de acetato y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina y la tirosina. Después, estas dos últimas, dan lugar a los ácidos cinámico y parahidroxicinámico; siendo que al condensarse con las unidades de acetato dan origen a la estructura cinamol de los flavonoides. Más tarde se forman los derivados glicosilados o sulfatados.¹⁹

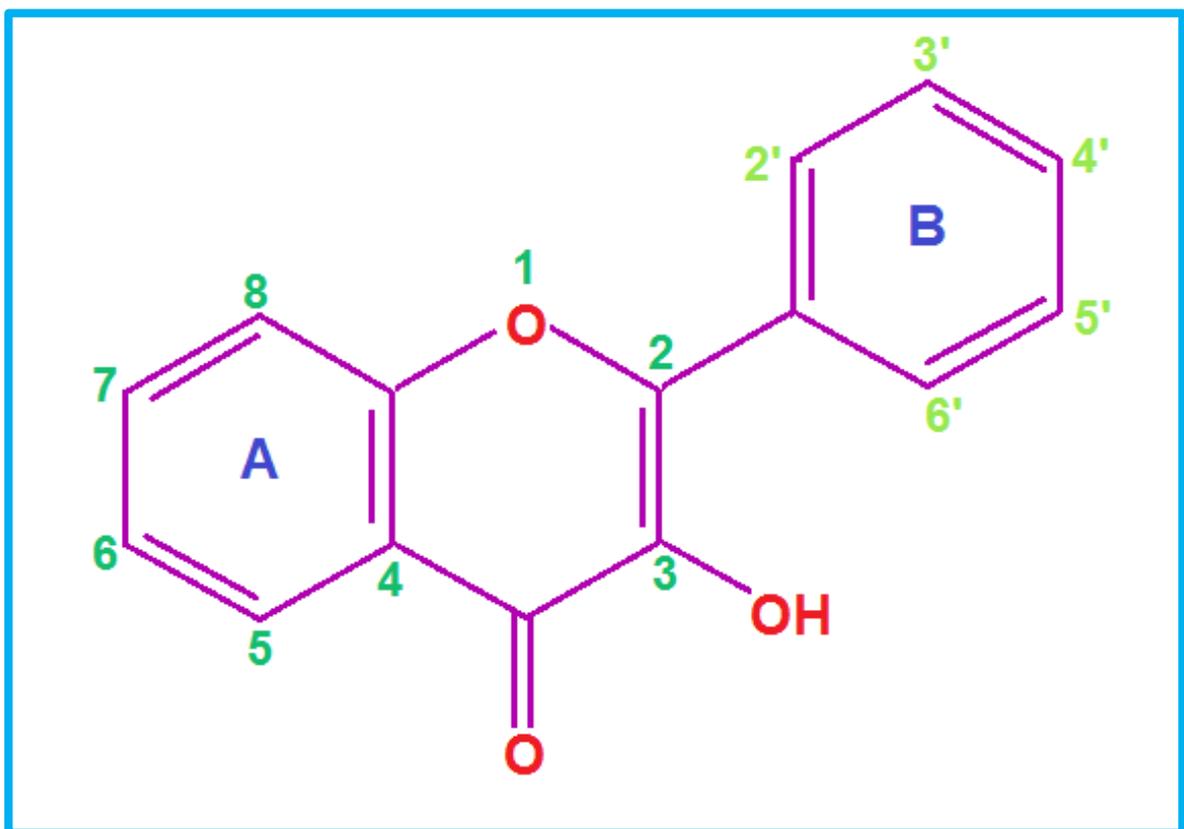


Figura 2. Estructura química de flavonoide con numeración y especificación de cada heterocíclico.¹⁹

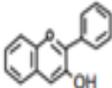
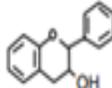
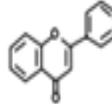
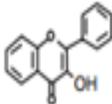
Nombre	Descripción	Ejemplo	Estructura
Antocianidinas	Tiene un grupo -OH unido en posición 3, pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C	Antocianidina	
Flavanos	Con un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Catequina	
Flavonas	Poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3	Diosmetina	
Flavonoles	Grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C	Quercetina	

Figura 3. Clasificación de los flavonoides.¹⁹

2.3.4. Flavonas y flavonoles

En esta molécula representa la mayoría de los flavonoides *Stricto sensu* conocidos, el ciclo A se encuentra en más del 90% de los casos sustituidos por dos hidroxilos fenólicos en C5 y C7.

Estos hidroxilos se pueden encontrar libres o esterificados, uno de ellos puede participar en un enlace heterosido. Un tercer hidroxilo libre en las chalconas, es biogenéticamente el origen del átomo de oxígeno del ciclo piránico de los demás flavonoides y del oxígeno del ciclo furánico de las auronas.

Se puede presentar otras sustituciones, con frecuencia variables: Hidrofilos libres o esterificados en C6 y/o del C8, isoprenilacion o mutilación en C6 o C8 implicación del C6 y/o del C8 en un enlace carbono – carbono con un azúcar.

El ciclo B sustituido en un 80% de los casos en C4, puede encontrarse 3,4-disustituidos, o en menor frecuencia 3-4,5-trisustituido; los sustituyentes son grupos OH o OCH₃. Las demás posiciones (C2 y C6) solo se sustituyen de forma excepcional.

La distribución de las flavonas y flavonoles y de sus heterosidos es universal, pero algunos esquemas de sustitución se encuentran registrados a familias o a grupo de familias de ahí su interés en términos de quimiotaxonomía: así los flavonoides 6-O- sustituidos se encuentran frecuentemente en lamiaceae, retaceae y asteraceae, las 5 desoxiflavonas en fabaceae y en myrtales, los flavonoides 2-O- sustituidos en laminaceae, solanaceae y el exudado arenoso que recubre las hojas y las inflorescencias.¹⁹

2.3.5. Propiedades de los flavonoides

1. **Solubilidad.** Depende de la forma en que se encuentran: Agliconas libres o heterósidos.
 - a. **Aglicones.** Son insolubles en agua, poco solubles en mezclas hidroalcohólicas y solubles en solventes orgánicos ya sean polares (etanol, metanol) o apolares (éter etílico, cloroformo).
 - b. **Heterósidos.** Son solubles en agua y en mezclas hidroalcohólicas.²¹
2. **Acidez.** Debido a las funciones fenol, son ionizables en medio básico, lo cual permite su identificación porque tienen reacciones coloreadas con ciertos compuestos. Producen generalmente soluciones amarillas que al acidificar viran a incoloras.
3. **Agentes quelantes.** Ciertos grupos funcionales de los flavonoides son capaces de formar complejos con metales como el Fe^{3+} (FeCl_3) o el Al^{3+} (AlCl_3).
4. **Reacción de coloración.** Muchos presentan fluorescencia al ser expuestos a la luz ultravioleta (UV) que pueden modificarse en medio básico, con los agentes quelantes, etc.²²
5. Son sustancias fácilmente oxidables y por lo tanto, antioxidantes porque se oxidan con mayor rapidez que otro tipo de sustancias.

Identificación. Generalmente se identifican por cromatografía en capa fina (CCF) usando como revelador la luz UV. Se pueden observar diferentes reacciones para su identificación.²¹

2.3.6. Utilización de los flavonoides en terapéutica

Los flavonoides se utilizan sobre todo en el terreno capilar-venoso: Solos o asociados, son constituyentes habituales de vasculoprotectores, venóticos y de tópicos utilizados en flebología.²⁰

Las tres actividades más importantes que se le atribuyen a los flavonoides son:

- 1. Acción antioxidante.** Posee la capacidad de reducir radicales libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres. Esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer, así como en procesos de envejecimiento.²³
- 2. Acción antiinflamatoria.** Los flavonoides son considerados sustancias bioactivas relativamente no tóxicas que presenta una gran variedad de efectos biológicos (prevención de enfermedades coronarias, cáncer, desórdenes gastrointestinales e inflamación). Las propiedades antiinflamatorias se deben a su acción antioxidante y habilidad de actuar contra las histaminas conjuntamente con otros mediadores de la inflamación como las prostaglandinas y leucotrienos.²⁴
- 3. Actividad vasoprotector.** Los flavonoides tienen la capacidad de disminuir la permeabilidad capilar, aumentando su resistencia. Su mecanismo puede ser una combinación de la supresión en la síntesis de prostaglandinas, activan las elastasas y otras hidrolasas catabólicas; por lo tanto la disminución de su síntesis puede explicar el fortalecimiento del tejido conectivo. Los flavonoides actúan como agentes economizadores del ácido ascórbico de la oxidación.²³

2.4. EXTRACTO VEGETAL

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter , de elementos solubles , constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca.²⁵

2.4.1. Consistencia de los extractos

La consistencia ideal que debían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: Blandos, firmes, secos y fluidos.

2.4.1.1. Extractos blandos

Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa.

2.4.1.2. Extracto firme

Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener las características especiales de no adherirse a los dedos.

2.4.1.3. Extracto seco

Anteriormente se les conocía con la denominación de “Sales esenciales”, son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente eliminado. Contiene tan solo del 5 al 8 % de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. La forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas, pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extracto.

2.4.1.4. Extracto fluido

Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada.²⁶

2.4.2. Características de los extractos

Estudios realizados por Corpas y Barrero, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos:

- a. Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claro.
- b. Algunos son de color café amarillento, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas son verdosas debido a la clorofila.
- c. Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- d. Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- e. La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- f. Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- g. Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholímetro del alcohol con el cual han sido preparados.

Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan solución verdosa pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. ²⁶

2.4.3. Conservación de los extractos

Los extractos son medicamentos en donde la alteración modifica y varía notoriamente la naturaleza del producto. En principio, un extracto seco o de tipo pilular se conserva mejor que un extracto acuoso. Esto no es totalmente exacto, pues la naturaleza del producto interviene igualmente. Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorben humedad atmosférica. Algunos se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos. Por otra parte, las alternativas más frecuentes consisten en modificaciones químicas no aparentes como sucede con los extractos de flores verdes que por la oxidación de la clorofila pierden su color.

Según Corpas y Barriga la conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

- a. Se deben conservar protegiéndolos de la luz.
- b. Los envases deben estar tapados.
- c. Se deben conservar en un medio ambiente seco.

Desde luego, son numerosos los métodos que se han indicado para la conservación de los extractos. Para mayor comodidad ellos se pueden clasificar, en dos categorías.

En el primer grupo tenemos aquellos a los cuales no se les ha adicionado ninguna materia extraña. Al segundo grupo, por el contrario, pertenecen aquellos extractos que han sido objeto de la adición de productos extraños, de naturaleza físico - química definida. ²⁶

2.5. *Streptococcus mutans*

Son cocos Gram positivos, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos, los cuales miden de 0,5 – 0,8 μm de diámetro, anaerobios facultativos, forman parte de la flora microbiana residente de la cavidad bucal y vías respiratorias altas, son patógenos oportunistas en enfermedades humanas como la caries dental y la endocarditis infecciosa, entre otras.²⁷

2.5.1. Medios de cultivo para *Streptococcus mutans*

Son anaerobios facultativos, la temperatura óptima de desarrollo es de 36 \pm 1°C, una práctica aconsejable según José Liébana es incubar las placas inoculadas 24 horas en anaerobiosis y posteriormente 24 horas en aerobiosis lo que favorece la formación de agua oxigenada que es un importante carácter diferencial por la síntesis de polisacáridos extracelulares que facilita el reconocimiento de las colonias.

Los medios de cultivo en los que se puede obtener colonias de *Streptococcus mutans* son:

- a. **Agar sangre de carnero** crecen cepas α - hemolíticos (destruyen parcialmente los eritrocitos), β - hemolíticos (destruyen totalmente los eritrocitos), γ - hemolíticos (no tienen actividad destructora sobre los eritrocitos).
- b. **Agar mitis-salivarius (MSA)** que contiene un 5 por 100 de sacarosa y como sustancias inhibitoras telurito potásico, azul tripán y cristal violeta, este medio es poco selectivo.
- c. **Mitis-salivarius-bacitracina (MBS)** contiene agar mitis-salivarius al que se le añade 0,2 U/mL de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100. Este medio es muy selectivo y es el que se utilizó para realizar la técnica “aislamiento y cuantificación de *Streptococcus mutans* en saliva” técnica descrita y llevada a cabo en esta investigación.

d. **Agar con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina (TYCSB)** se ha desarrollado debido a que no es inhibidor del serotipo *Streptococcus criceteus* como en el caso de los medios de cultivo anteriores los cuales inhiben completamente al microorganismo.²⁸

2.5.2. ***Streptococcus mutans* como iniciador de caries dental**

El *Streptococcus mutans*, fue aislado por Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas en humanos, es el primero en colonizar la superficie del diente después de la erupción. Su nombre lo recibe por su tendencia a cambiar de forma, que se puede encontrar como coco (forma redonda) en un medio alcalino, o en forma de cocobacilo (forma ovalada) en un medio ácido.

Esta bacteria es anaeróbica facultativa, es decir, puede utilizar el oxígeno para crecer, pero si éste no está presente también puede sobrevivir; sin embargo su crecimiento óptimo ocurre en anaerobiosis.²⁹

2.5.3. **Adquisición del *Streptococcus mutans***

El *Streptococcus mutans* se encuentra de forma permanente en la cavidad oral después de la erupción dental, debido a que requiere de tejido duro no descamativo para su colonización. La principal fuente de adquisición y transmisión de *Streptococcus mutans* en los niños es la saliva de la madre transmitida cuando hay un contacto salival con la comida que se le dará al bebé, estas evidencias provienen de estudios que demuestran un patrón idéntico de DNA cromosomal en las bacterias de los niños y de las madres.

Se ha demostrado que el tiempo exacto de colonización de esta bacteria es a los 26 meses de edad, coloniza especialmente las superficies duras de la cavidad oral (esmalte y cemento), induce a las lesiones cariosas tanto en superficies lisas, de fosas y fisuras como en zonas interproximales y en el cemento radicular. A nivel extraoral el *Streptococcus mutans* está relacionado con endocarditis subagudas y raramente con otros procesos patológicos.²⁸

2.5.4. Factores de virulencia del *Streptococcus mutans*

Los factores de virulencia o características del *Streptococcus mutans* que lo hacen patógeno son:

- a. **Acidogenicidad.** El *Streptococcus* puede fermentar los azúcares de la dieta y producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo ocasionando que el pH baje y se desmineralice el esmalte.
- b. **Aciduricidad.** Capacidad del *Streptococcus* para producir ácido en un medio pH bajo. Acidofilicidad: el *Streptococcus* puede resistir la acidez del medio, propiedad que es muy necesaria para sobrevivir y desarrollarse en un pH bajo.
- c. **Producen dextranasas y fructanasas.** Enzimas que son capaces de metabolizar los polisacáridos extracelulares favorece la producción de ácido y constituye un sustrato en los periodos en que disminuye el aporte de oxígeno.
- d. **Corto efecto post-pH.** Requiere de poco tiempo para recuperar su actividad de crecimiento habitual tras ser sometido a un pH bajo.²⁸

2.6. GLUCONATO DE CLORHEXIDINA

2.6.1. Historia:

La clorhexidina se desarrolla en la década de los 40 por Imperial Chemical Industries en Inglaterra por científicos en un estudio contra la malaria, aunque nunca fue utilizada con este fin. En ese momento los investigadores fueron capaces de desarrollar un grupo de compuestos 20 denominados polibiguanidas que demostraron tener un amplio espectro antibacteriano y salió al mercado en 1954 como antiséptico para las heridas de la piel. Posteriormente comenzó a utilizarse en medicina y cirugía tanto para el paciente como para el cirujano.

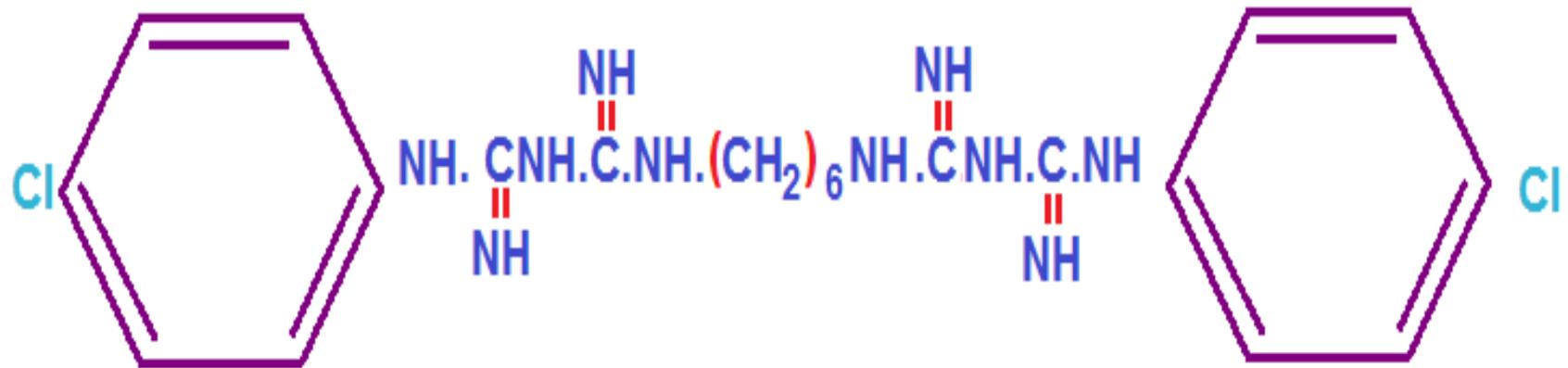
En odontología empezó a utilizarse para desinfección de la boca y en endodoncia. El estudio definitivo que introdujo la clorhexidina en el mundo de la periodoncia, fue el realizado por Løe y Schiott en 1970 donde se demostró que un enjuague de 60 segundos dos veces al día con una solución de gluconato de clorhexidina al 0,2 % en ausencia de cepillado normal, inhibía la formación de placa y el desarrollo de gingivitis.

Según Altannir y colaboradores en 1994 la clorhexidina es de uso corriente en más de noventa países y que más diez mil millones de aplicaciones de gluconato de clorhexidina han sido llevadas a cabo en los dos últimos años.³⁰

2.6.2. Características del Gluconato de clorhexidina

La clorhexidina es una molécula bicatiónica simétrica, es un dímero proguanil por lo que decimos que es una bisguanida, la cual está conectada por una cadena central hexametileno. En cada extremo se enlaza un radical paraclorofenil (2 anillos 4 clorofenil), resultando su nombre completo: paraclorofenilbiguanida.³⁰

Este compuesto es una base fuerte dicatiónica a pH superior a 3,5 con dos cargas positivas en cada extremo del puente hexametileno. Es esta naturaleza dicatiónica la que lo hace extremadamente interactiva con los aniones, lo que es relevante para su eficacia, seguridad, efectos secundarios colaterales y su dificultad para formularla en productos. Aunque es una base, la clorhexidina se mantiene más estable en su forma de sal y la preparación más común es la sal de digluconato por su alta solubilidad en agua.³⁰



1:1,6-di(4-clorofenildiguanida)hexano

Figura 4. Estructura química de Clorhexidina.³⁰

2.6.3. Mecanismos de acción

Clorhexidina se une fuertemente a la membrana celular bacteriana, lo que a bajas concentraciones produce un aumento de la permeabilidad con filtración de los componentes intracelulares incluido el potasio (efecto bacteriostático). En concentraciones más altas produce la precipitación del citoplasma bacteriano y muerte celular (efecto bactericida).

En boca se adsorbe rápidamente a las superficies de contacto, incluidos los dientes con película adquirida, proteínas salivales y a la hidroxiapatita. Los depósitos de clorhexidina se forman por la interacción reversible de la molécula de clorhexidina con grupos fosfato, sulfato y carboxilo de los tejidos blandos y duros.

La clorhexidina adsorbida se libera gradualmente en 8 -12 horas en su forma activa. Después de 24 horas aún pueden recuperarse concentraciones bajas de clorhexidina, lo que evita la colonización bacteriana durante ese tiempo.³⁰

2.6.4. Espectro de acción

Clorhexidina tiene un extenso espectro de actividad antimicrobiana. Es activa frente a un amplio rango de organismos Gram + , Gram - y en hongos. Estos microorganismos no tienen el mismo grado de sensibilidad a clorhexidina. Por ejemplo los microorganismos Gram + son más sensibles que los Gram -, mientras que los estreptococos son más sensibles que los estafilococos.³⁰

2.6.5. Farmacocinética

Los estudios farmacocinéticos de clorhexidina, indican que aproximadamente el 30 % del principio activo, se retiene en la cavidad oral después del enjuague. La clorhexidina retenida se libera lentamente en los fluidos orales. Estudios realizados en animales y en humanos, demuestran la escasa absorción del fármaco en el tracto gastrointestinal.³⁰

2.6.6. Concentración

La clorhexidina suele presentarse en dos concentraciones al 0,12 % y al 0,2 %, se recomienda realizar un buche con 10 mL de producto a una concentración del 0,2 % y de 15 mL al 0,12 %, esto es debido a la dosis total de clorhexidina ya que 10 mL al 0,2 % libera 20 mg y 15 mL al 0,12% libera 18 mg, observándose que los resultados con ambas formulaciones son igual de efectivos.

Las últimas investigaciones van encaminadas a conseguir una formulación de clorhexidina en medio no alcohólico igual de efectiva que la formulación de la misma en solución alcohólica. Según el estudio de se consigue con una combinación de clorhexidina al 0,12 % sin alcohol a la que se añade cetilpiridinio al 0,005 % (nueva formulación de Perio Aid), resultando igual de efectiva en el control de la formación de nueva placa que clorhexidina con alcohol al 0,12 % (Perio Aid) y que clorhexidina con alcohol al 0,2 % (Corsodyl).³⁰

2.6.7. Indicaciones

2.6.7.1. Aplicaciones. Antisepsia de la piel en solución acuosa al 4 % con base detergente para el lavado corporal prequirúrgico del paciente y lavado de manos quirúrgico. También y en solución acuosa al 5 % para antisepsia del campo quirúrgico.

Por su afinidad con la piel tiene una acción remanente de varias horas de duración. Sobre heridas se utiliza a la concentración 0,1 ó 0,5 % en solución acuosa.

Además puede emplearse en Ginecología, en quemaduras (ya que puede mezclarse con antibióticos de acción sinérgica) y en higiene del personal hospitalario.

Se ha valorado su uso en antisepsia del cordón umbilical y, si bien, se ha demostrado muy efectiva al reducir la colonización bacteriana, alarga el tiempo de desprendimiento y aumenta la colonización ulterior. Aunque uno de sus usos es la higiene bucal, no se suele emplear, excepto si va unida a edulcorantes potentes, pues es muy amarga.³⁰

2.6.8. Efectos adversos

El efecto colateral más frecuente en la utilización de clorhexidina es la tinción de dientes. No parece claro si la tinción es dosis dependiente así Rebstein en 1978 concluyó que no lo era, ya que reduciendo la concentración de clorhexidina al 0,0025 %, seguían presentándose las manchas.

Las tinciones suelen localizarse en el tercio cervical de la corona y en las zonas interproximales. Las manchas son más evidentes en la unión amelocementaria expuesta o superficies radiculares, fosas y fisuras.

La seguridad de la clorhexidina ha sido ampliamente documentada en la literatura. Kenney en 1972 informa que una exposición de dos minutos a clorhexidina al 0,2 %, puede producir alteración de la membrana celular en algunos polimorfonucleares. Se han descrito también lesiones descamativas en la mucosa alveolar después de enjuagues con clorhexidina al 0,2 %. La descamación de células epiteliales puede suceder con alta concentración más frecuentemente que con baja.³⁰

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES

3.1.1 Lugar de ejecución.

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de Setiembre del 2016 a Febrero del 2017, en el laboratorio de productos naturales – Universidad Privada Norbert Wiener.

3.1.2. Material vegetal.

Hojas de *Schinus molle* L. “Molle”

3.1.3. Materiales para la elaboración del extracto.

- Balanza mecánica “Mettler”
- Licuadora “Oster”
- Beacker x 2 L “Pyrex”
- Alcohol 70° “Aky”
- Agua destilada “Aky”
- Soporte Universal “Belart”
- Embudo 75 mL “Pyrex”
- Papel filtro 20 cm x 20 cm “Whatman”
- Algodón x 500 g “Quirmex”
- Gasa 20 cm x 20 cm “Quirmex”
- Fuente de vidrio “Pyrex”
- Frasco ámbar
- Estufa esterilizadora a calor seco circulación natural de aire, modelo 5NE40, marca Memmert - Alemania

3.1.4. Materiales para el análisis cualitativo del extracto de las hojas *Schinus molle* L. “Molle”.

- Balanza analítica, modelo BT-260k. , serie 0012314
- Tubo de ensayo 13 x 100 “Pyrex”
- Beacker 50 y 100 mL “Pyrex”
- Bagueta o varilla de vidrio “Metrix”
- Espatula de metal “Nalgene”

- Goteros “Nalgene”
- Gradilla para tubos de ensayo “ Eppendorf ”
- Pinza de madera “Belart”
- Pipetas 1 mL, 2 mL y 5 mL “Pyrex”
- Propipeta de goma “Vicking”
- Lámpara de Luz UV 366nm”Ultraviolet”

3.1.5. Solventes

- Etanol Q.P “Merck Peruana”
- Metanol Q.P “Merck Peruana”
- N-butanol Q.P “Merck Peruana”
- Acetato de etilo Q.P “Merck Peruana”
- Éter etílico Q.P “Merck Peruana”
- Acetona Q.P “Merck Peruana”
- Benceno Q.P “Merck Peruana”
- Cloroformo Q.P “Merck Peruana”
- Éter de petróleo Q.P “Merck Peruana”

3.1.6. Reactivos.

- Tricloruro de aluminio
- Reactivo de Shinoda
- Tricloruro férrico
- Reactivo de Molish
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Popoff
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Bertrand
- Reactivo de sonneschein
- Reactivo de Liebermann-Burchard
- Reactivo de Fehling A y B
- Reactivo de Ninhidrina

3.1.7. Material y equipos para la preparación de medios de cultivo.

- 5 Pipetas 0,5 mL “ Pyrex”
- 5 Pipetas 1,0 mL “ Pyrex”
- 5 Tubos 10 mm x 100 mm “ Pyrex”
- Gradilla para tubos de ensayo
- Mechero de Bunsen “Neolab”
- 40 Placas petri esteriles descartables
- Agar Sangre “ Merck”
- Sangre de ovino desfibrinada
- Anaerocult® de Merck
- 2 Asas de siembra de metal
- 2 Pinzas esteriles
- Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- Halos de papel filtro esteriles 47
- Refrigerador, marca LG/ER, serie 27177 BQ
- Autoclave , serie 01-00002591

3.1.8. Otros.

- Gluconato de clorhexidina al 0,12%
- Agua destilada

3.2. MÉTODO

3.2.1. Tipo de investigación

De acuerdo a las características de la investigación y los objetivos planteados se determinó un estudio de tipo experimental, “in vitro”, transversal, prospectivo, analítico y bibliográfico.

- **Es experimental** debido a que se utilizó dos grupos experimentales representado por discos de papel filtros embebidos con el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” y otro representado por discos de filtro embebidos en gluconato de clorhexidina al 0,12%
- **In vitro** debido a que el estudio se realizó con medios de cultivo que enriquecen el crecimiento bacteriano, el cual se maneja en laboratorios.
- **Es transversal** debido a que la observación de variables fue en un tiempo determinado y delimitado.
- **Es prospectivo** debido a que la recolección de datos depende de los hechos ocurridos.

Es analítico debido a que se desintegraron cada uno de los temas a tratar en la investigación para obtener los objetivos planteados

- **Es bibliográfico** ya que en esta investigación es importante basarnos en varios autores de textos, libros y artículos de revistas indexadas que nos aporten información confiable.

3.2.2. Muestra

La selección de la muestra se realizó intencionalmente de una especie de microorganismo puro: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se comprobó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” a concentraciones del 500 y 1000 mg/mL, agua destilada y gluconato de clorhexidina al 0,12%. Se realizó 20 repeticiones por cada sustancia con un tiempo de exposición de 48 a 72 horas en el estudio.

3.3. METODOLOGÍA Y PROCEDIMIENTO

3.3.1. Recolección, tratamiento y obtención de las hojas de la especie de *Schinus molle* L. "Molle".

3.3.1.1. Recoleccion de la muestra vegetal

La muestra se recolectó en la ciudad de Lima, distrito Surco (154 m.s.n.m.), las cuales fueron conservadas en condiciones óptimas y requerimientos adecuados hasta su utilización para la elaboración del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle". Aproximadamente se recolecto 5 kg de materia prima.



Figura 5. Recoleccion de la especie vegetal *Schinus molle* L. "Molle"

3.3.1.2. Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”

Se usó 5 kg de hojas frescas y limpias de *Schinus molle* L. “Molle” se procedió a licuar las hojas con alcohol al 70 %, se realizó una maceración etanólica durante una semana en un frasco ámbar el cual se agitó diariamente, posteriormente se realizó el filtrado, el extracto líquido obtenido se depositó en una fuente de Pyrex y se concentró en la estufa esterilizadora a calor seco modelo 5NE40, marca Memmert a una temperatura de 40°C.



Figura 6. Lavado (1) y deshojado (2) de la especie *Schinus molle* L. “Molle”



Figura 7. Licuado de las hojas de la especie *Schinus molle* L. “Molle”

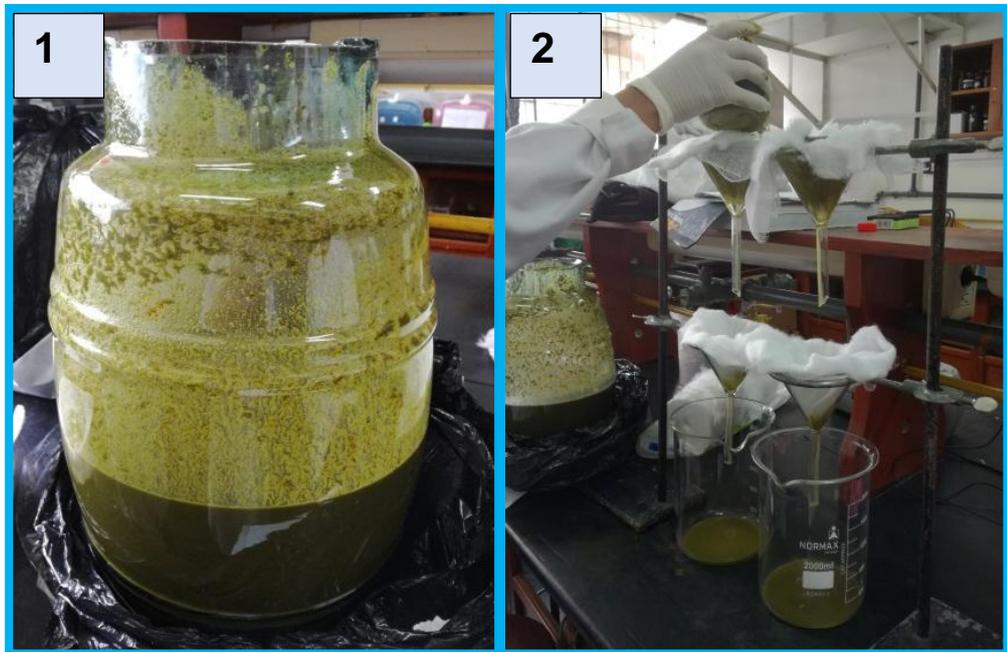


Figura 8. Maceración (1) y filtración (2) del solvente destilado de la maceración de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”

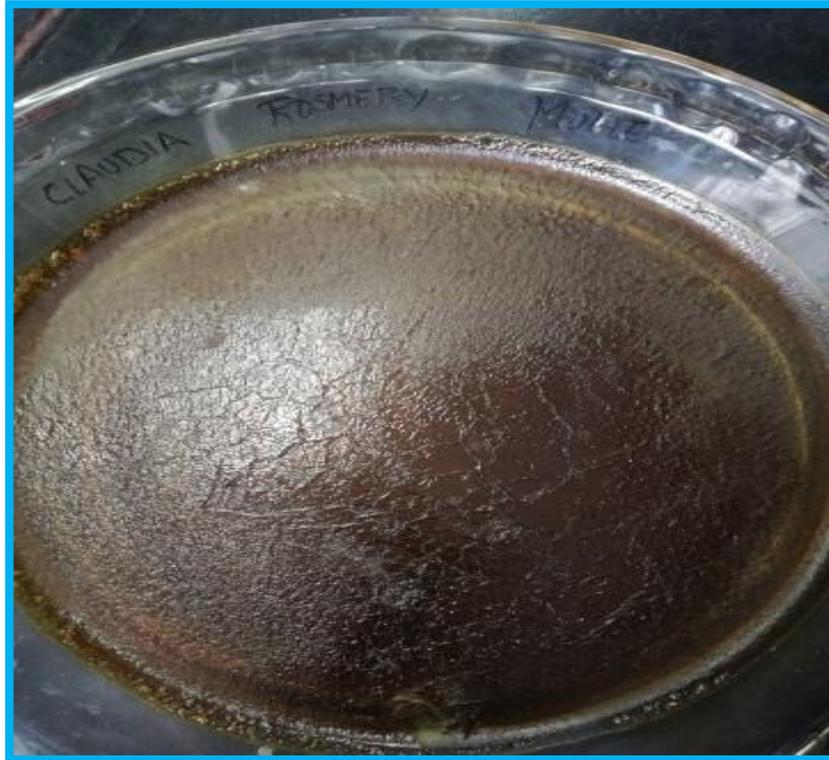


Figura 9. Extracto etanólico de las hojas de la especie de *Schinus molle* L.
"Molle"

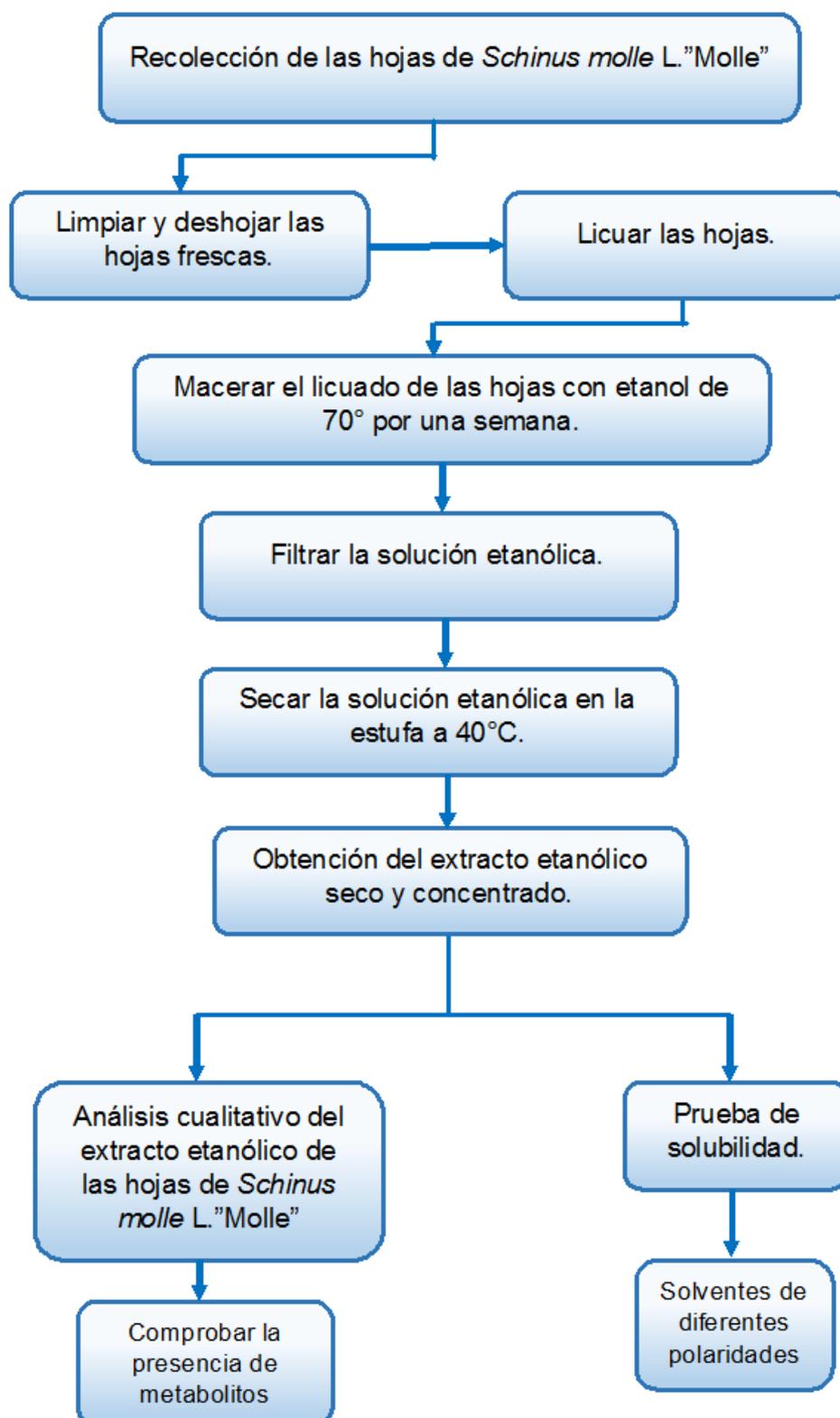


Figura 10. Análisis cualitativo y prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle"

3.3.2. ANALISIS CUALITATIVO DE LAS HOJAS DE *Schinus molle* L. “Molle”

3.3.2.1. Prueba de solubilidad.

La prueba de solubilidad permite conocer el comportamiento del extracto en soluciones de diferente polaridad.³²

En 10 tubos de ensayo se colocó 20 mg del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”, se le agregó a cada uno de los tubos 1 mL. del solvente así como: Agua destilada, etanol, metanol, N-butanol, acetato de etilo, éter etílico, acetona, benceno, éter de petróleo, cloroformo. Se agitó y se observó los resultados como se muestra en la **Tabla 2 y figura 23.**

3.3.2.2. Análisis cualitativo

Se realizó para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos del extracto etanólico, basado en la aplicación de pruebas de coloración y precipitación.⁸

Se solubilizó 20 mg del extracto de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” en etanol realizándose los siguientes ensayos de coloración y precipitación observándose los resultados mostrados en la **Tabla 3 y figura 24-26**

Tabla 1. Reactivos utilizados en el análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”

REACTIVOS	METABOLITOS
AlCl₃	Flavonoides
Shinoda	Flavonoides
FeCl₃ al 1 %	Compuesto fenólicos
Molish	Carbohidratos totales
Draguendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Popoff	Alcaloides
Bertrand	Alcaloides
Sonneschein	Alcaloides
Wagner	Alcaloides
Liebermann-Bourchard	Esteroides y/o Triterpenos
Ninhidrina al 1 %	Grupo amino libre
Fehling A y B	Azucares reductores

3.3.3. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

3.3.3.1. Actividad antimicrobiana

Método: Difusión de disco.¹⁰

Técnica: Siembra en superficie.¹⁰

3.3.3.1.1. Obtención de los microorganismos.

Se trabajó con una cepa de bacteria estándar de *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175) (American Type Culture Collection). Producto diseñado solo para propósito de estudio en investigaciones científicas in vitro.

3.3.3.1.2. Preparación del medio de cultivo

Para el crecimiento de *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175) (American Type Culture Collection). Se utilizó medios enriquecidos como el Agar sangre, el cual es en donde mejor se observa la actividad hemolítica de las especies.

Una vez escogido el medio previamente elaborado por el laboratorio se procedió a rotular 20 cajas Petri las cuales fueron utilizadas para la siembra.

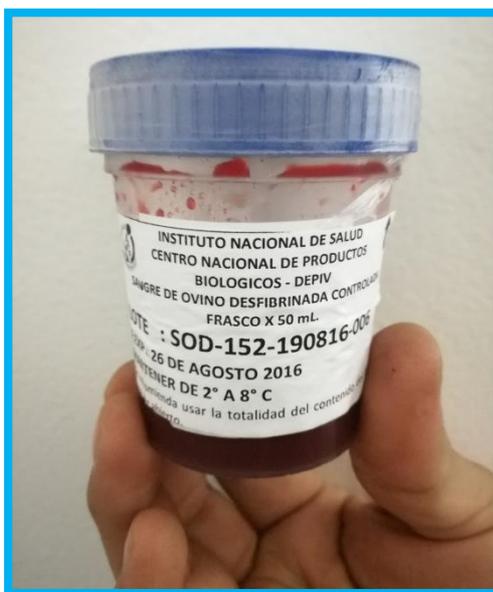


Figura 11. Sangre de ovino desfibrinada controlada

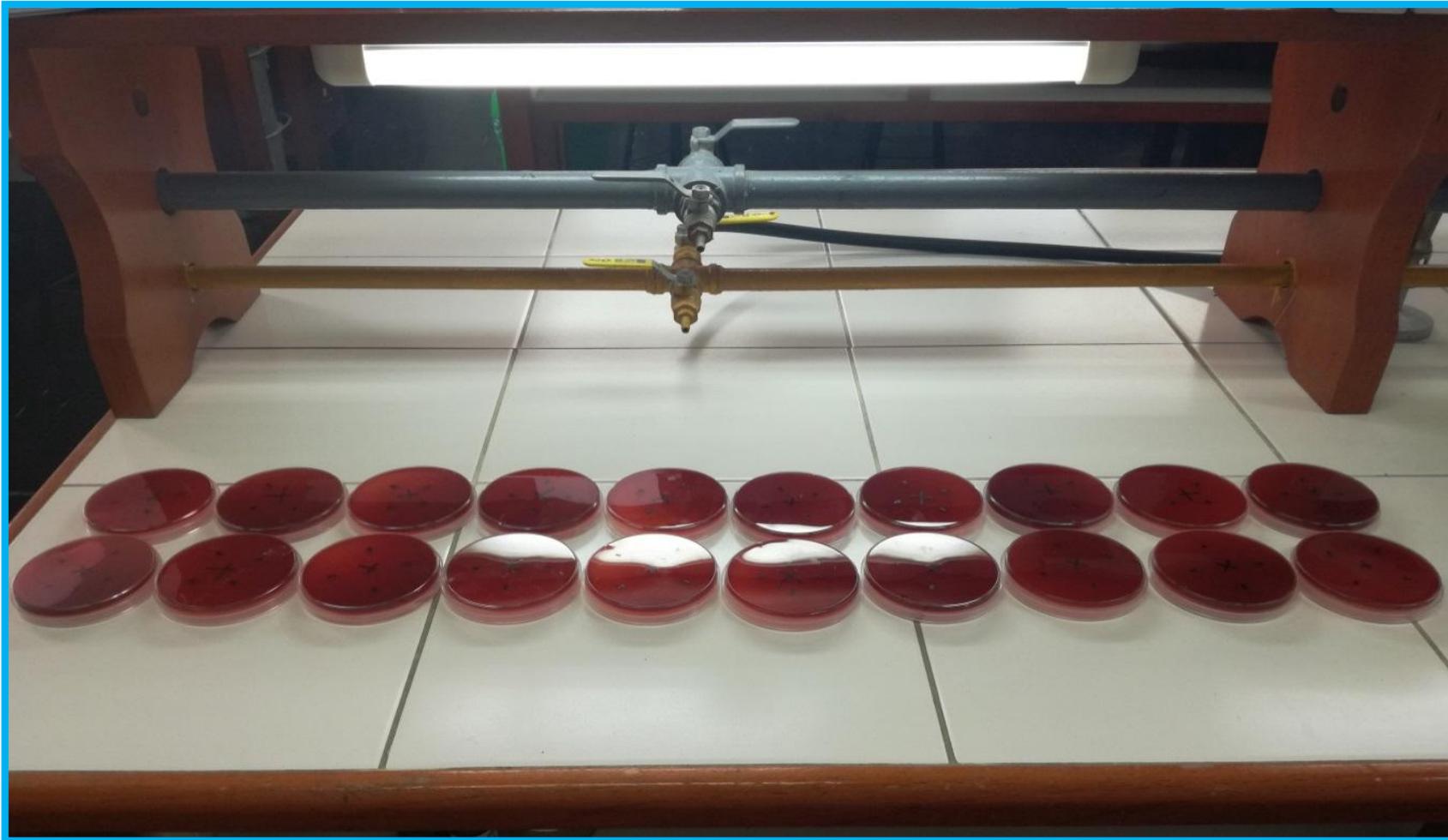


Figura 12. Medios de cultivo Agar sangre

3.3.3.1.3. Inoculación bacteriana.

Se preparó de acuerdo al tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland. Se obtiene al tocar con un hisopo estéril la superficie de una o varias colonias de cepas bacterianas. Se utilizó *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175)

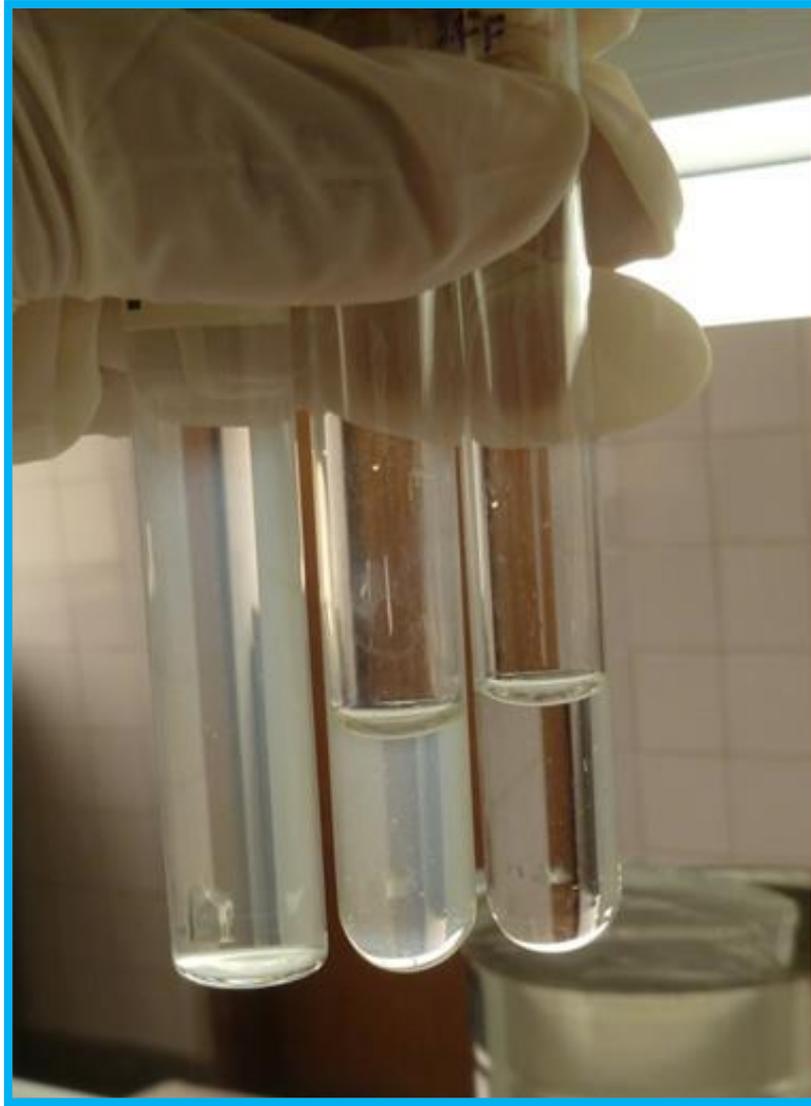


Figura 13. Cepa de *Streptococcus mutans* comparada a la escala de Mac Farland.

Debido a las sustancias volátiles con las que trabajamos se procedió a inocular, todas las cajas Petri de Agar sangre con la bacteria, utilizando el hisopado, es decir que un hisopo se tomó cierta cantidad de bacterias y se procedió a realizar el sembrado en tres direcciones.



Figura 14. Inoculación de placas Petri con *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175)

3.3.3.1.4. Discos de sensibilidad

El disco estándar se preparó con papel filtro WATMAN N°10 de 6 mm de diámetro y posteriormente se procedió a esterilizar. Su almacenamiento fue a temperatura ambiente antes de colocar sobre la superficie de agar con una pinza estéril presionando suavemente con la punta de la pinza para asegurar un contacto uniforme con el agar, cuidando de no moverlos una vez colocados.



Figura 15. Discos de papel filtro WATMAN N°10

3.3.3.1.5. Preparación de las sustancias en estudio.

Se utilizó el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” al 500 y 1000 mg/mL. Para realizar las diluciones en agua destilada como agente disolvente . Así mismo se utilizó gluconato de clorhexidina al 0,12% como control positivo, y agua destilada como control negativo.



Figura 16. Diluciones del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” al 500 y 1000 mg/mL. Agua destilada (control negativo) y gluconato de clorhexidina al 0,12%.

3.3.3.1.6. Inoculación de las sustancias en estudio.

Se tomó con la pipeta, 1mL de cada sustancia y se depositó en tubos de ensayo estériles, rotulados con el nombre de cada sustancia a utilizar para luego colocarlos en la gradilla. Posteriormente se utilizó una micropipeta para colocar 0.2ul de sustancia que se colocó en el disco de papel filtro, procedimiento que se repitió en todos los discos con todas las sustancias a analizar. Se procedió a sembrar los discos de papel filtro en las placas Petri, según la rotulación que correspondía en ella con cada sustancia. Finalmente las placas se llevaron a incubación a 37°C, por 48 y 72 horas respectivamente.



Figura 17. Proceso de inoculación de discos de papel filtro embebidos de la sustancia de estudio en placas petri.

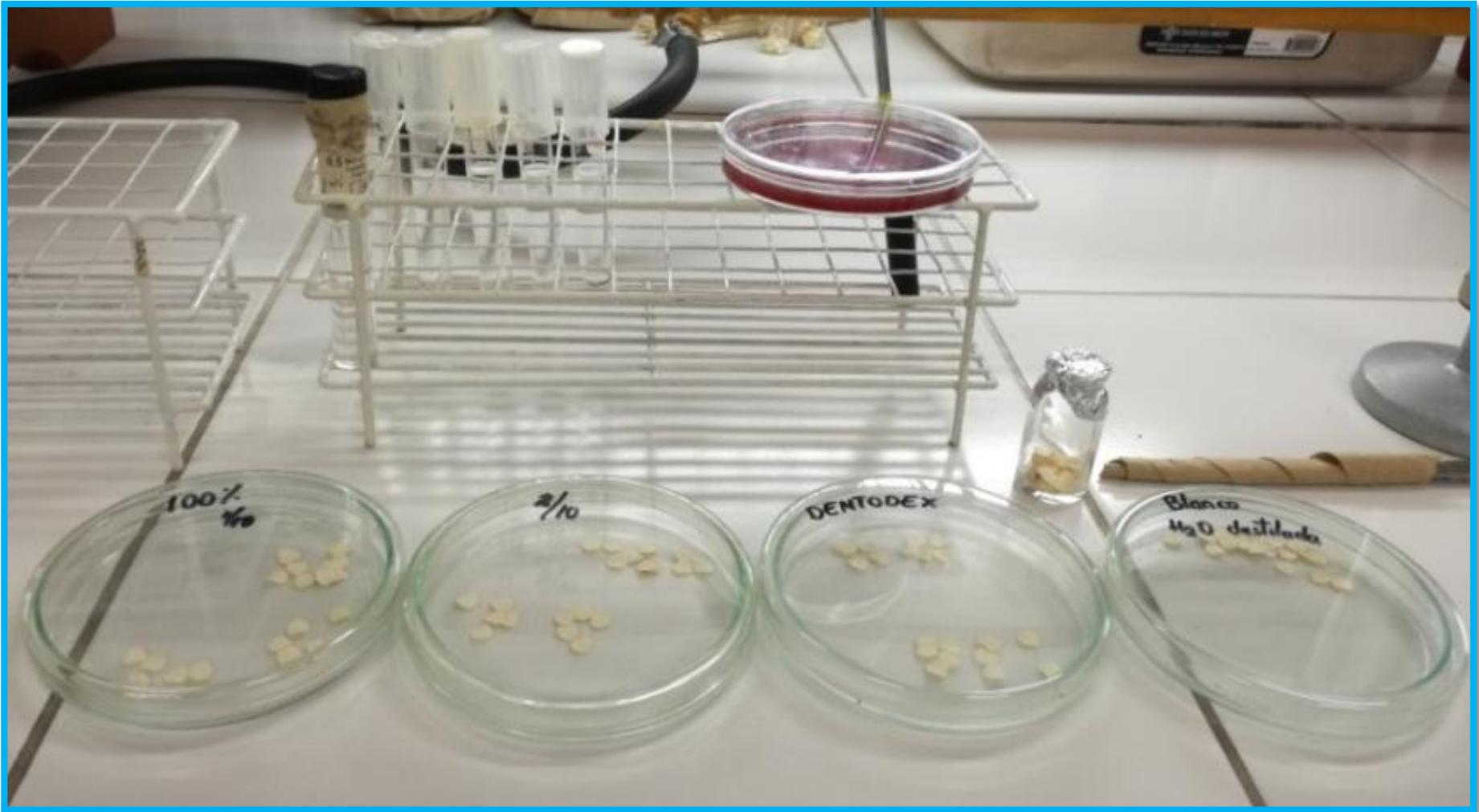


Figura 18. Material limpio y estéril para la realización del estudio antimicrobiano

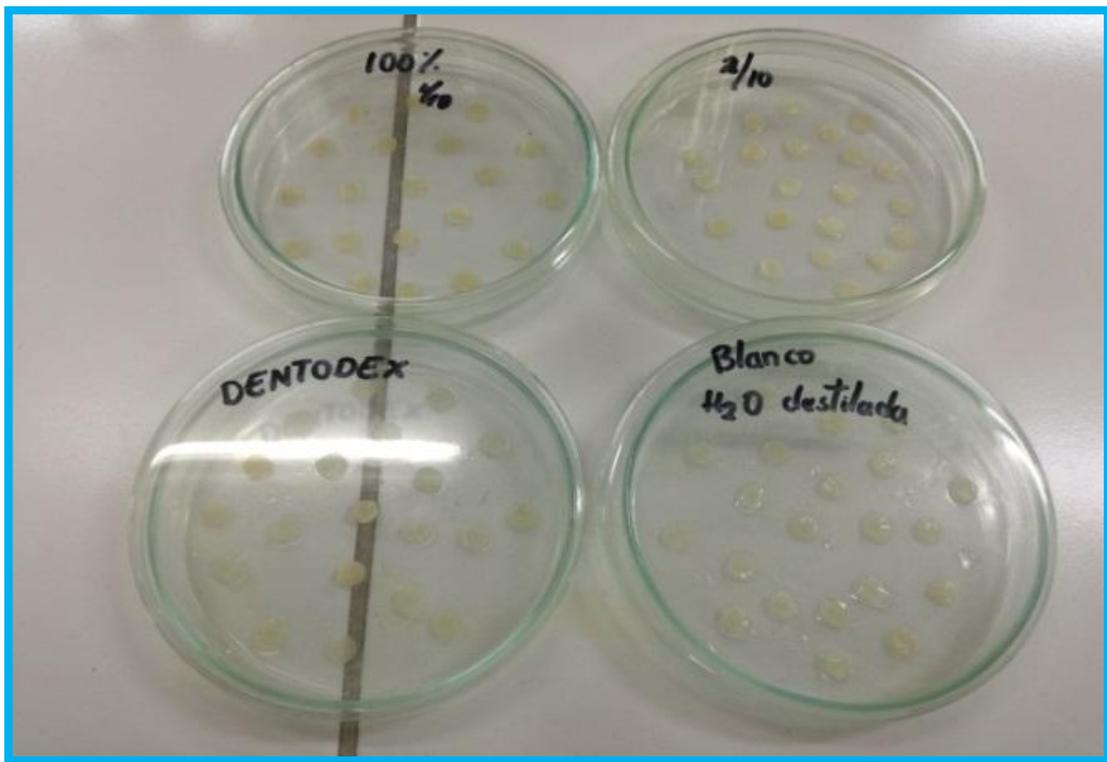


Figura 19. Discos de papel filtro embebidos con las sustancias de estudio.

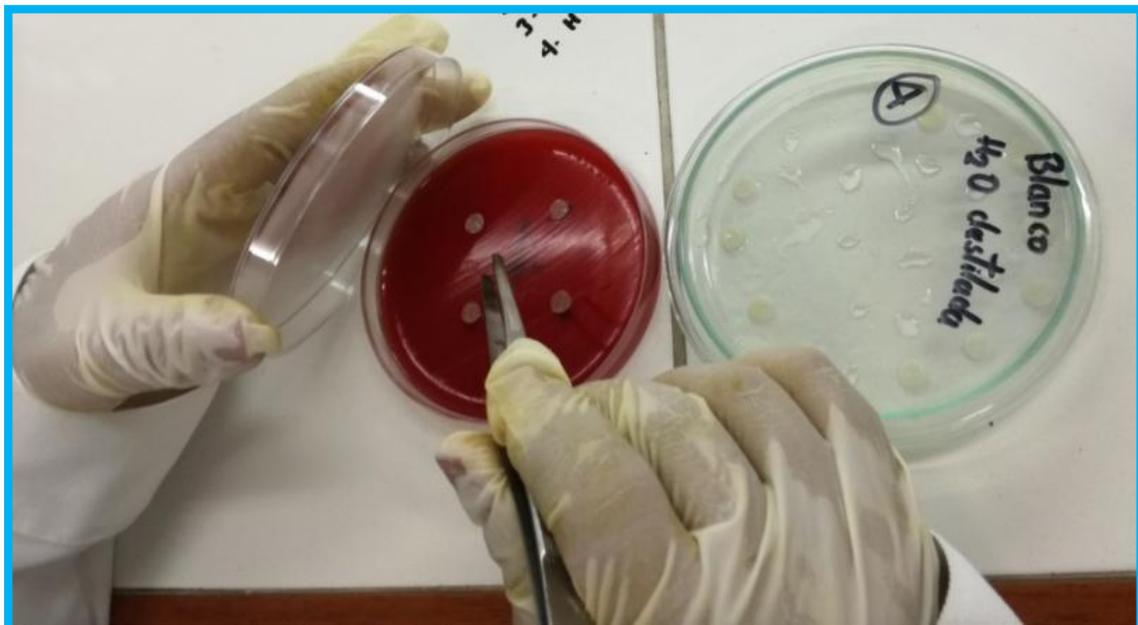


Figura 20. Colocación de los discos de papel filtro embebidos con las sustancias de estudio.



Figura 21. Incubación de las placas Petri en jarra anaerobia a 37°C.



Figura 22. Estufa esterilizadora a calor seco circulación natural de aire, modelo 5NE40, marca Memmert - Alemania

IV. RESULTADOS

4.1. PRUEBA DE SOLUBILIDAD

El extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle" es soluble en agua destilada y etanol e insoluble en solvente apolares. **Tabla 2 y Figura 23.**

Tabla 2. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle" (20mg del extracto de hojas /1mL del solvente).

SOLVENTES	SOLUBILIDAD
Agua destilada	+
Etanol	+
Metanol	+
N-butanol	-
Acetato de etilo	-
Éter etílico	-
Acetona	-
Benceno	-
Cloroformo	-
Éter de petróleo	-

Leyenda: Soluble (+), Insoluble (-)

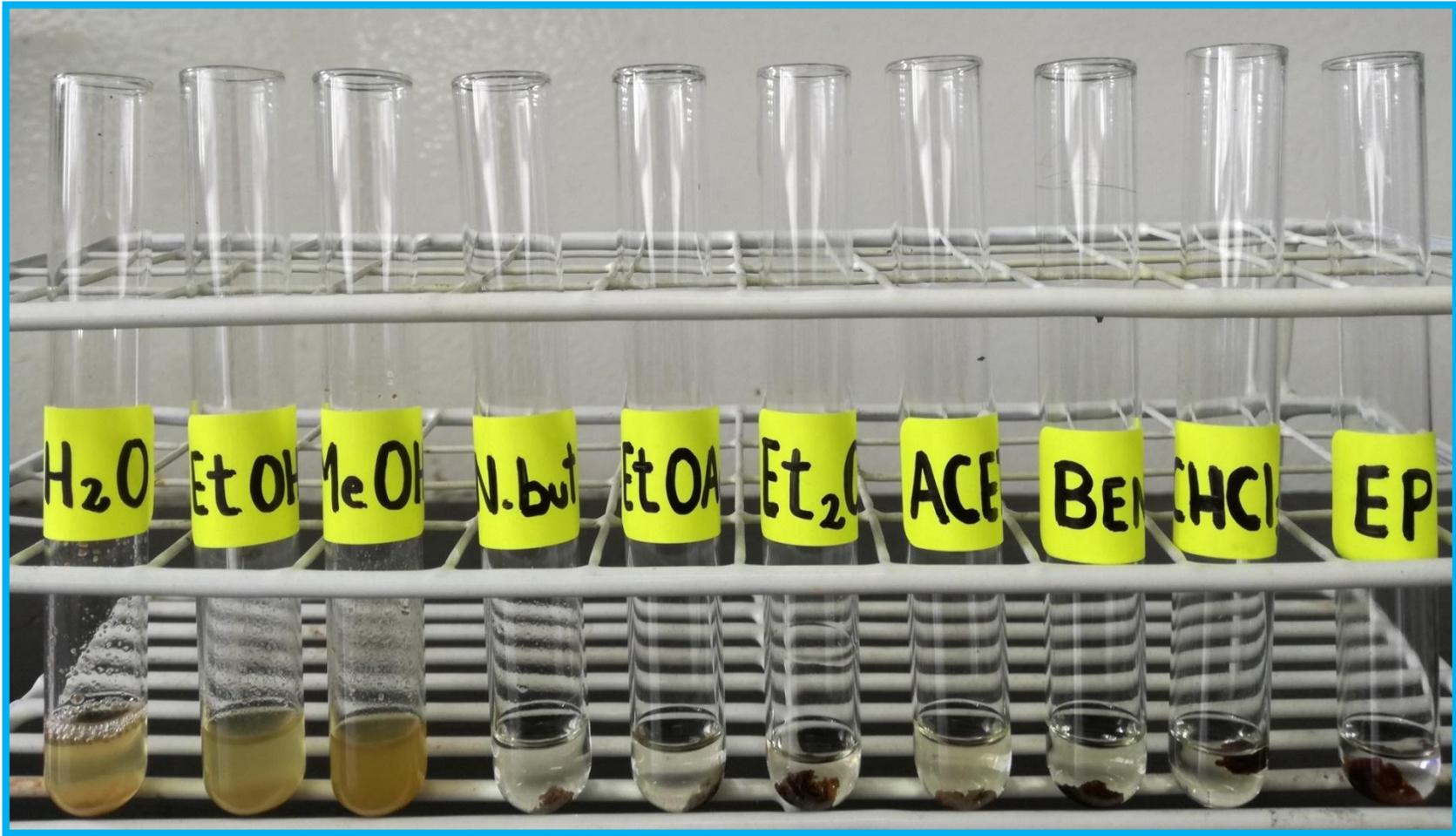


Figura 23. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle"

4.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Schinus molle* L."Molle"

Se realizó el análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L."Molle" el cual presenta metabolitos primarios los cuales son los azúcares reductores así como también el grupo amino libre y los secundarios que son los compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides y ausencia de saponinas.

Tabla 3. Análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle" (20mg del extracto de hojas /1mL del solvente).

REACTIVOS	METABOLITOS	RESULTADOS
AlCl₃	Flavonoides	+
Shinoda	Flavonoides	+
FeCl₃ al 1 %	Compuesto fenólicos	+
Molish	Carbohidratos totales	+
Draguendorff	Alcaloides	+
Mayer	Alcaloides	+
Popoff	Alcaloides	+
Bertrand	Alcaloides	+
Sonneschein	Alcaloides	+
Wagner	Alcaloides	+
Liebermann-Bourchard	Esteroides y/o Triterpenos	+
Ninhidrina al 1 %	Grupo amino libre	+
Fehling Ay B	Azúcar reductores	+

Leyenda: Presencia (+), Ausencia (-)

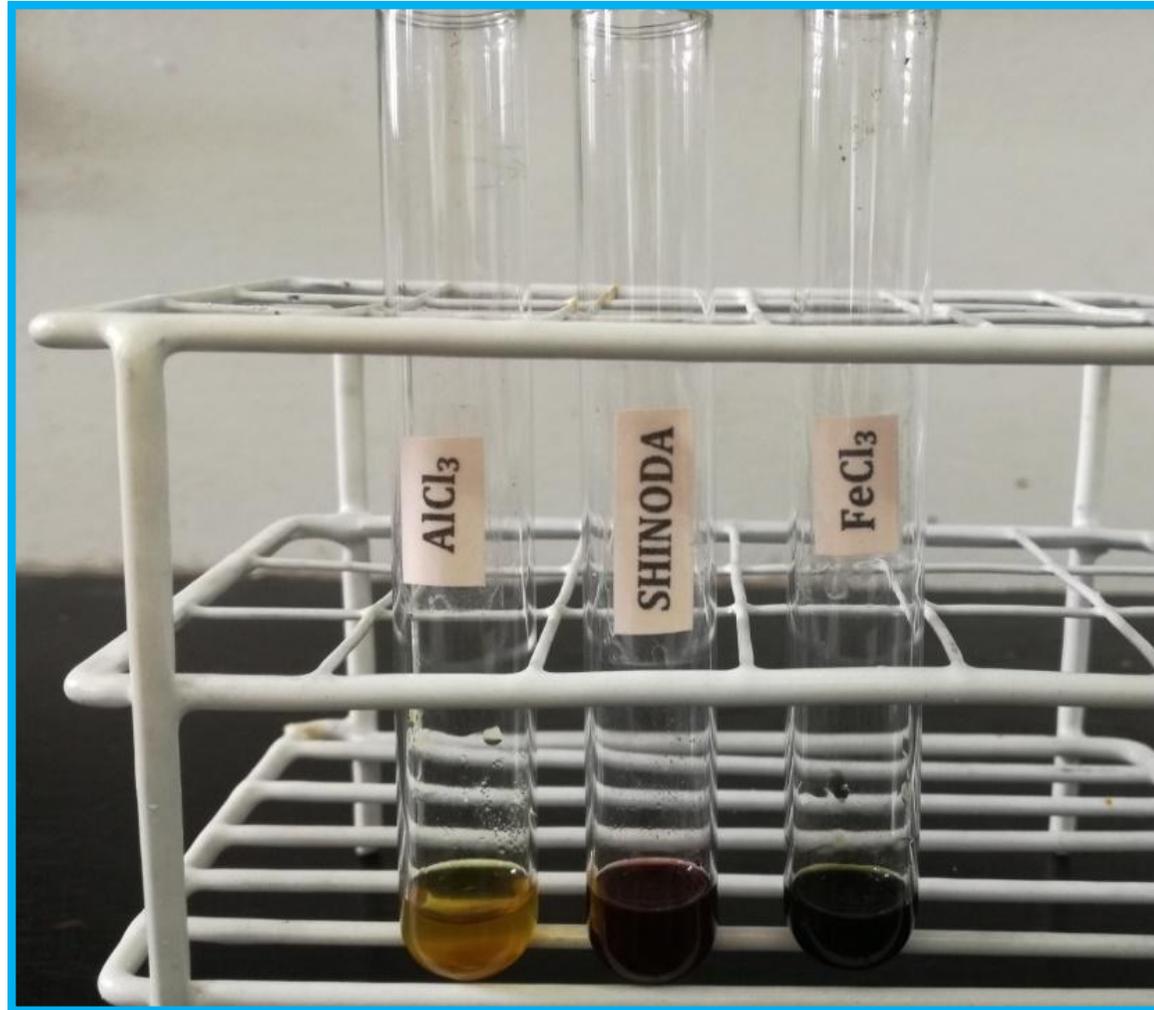


Figura 24. Reconocimiento de flavonoides del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”

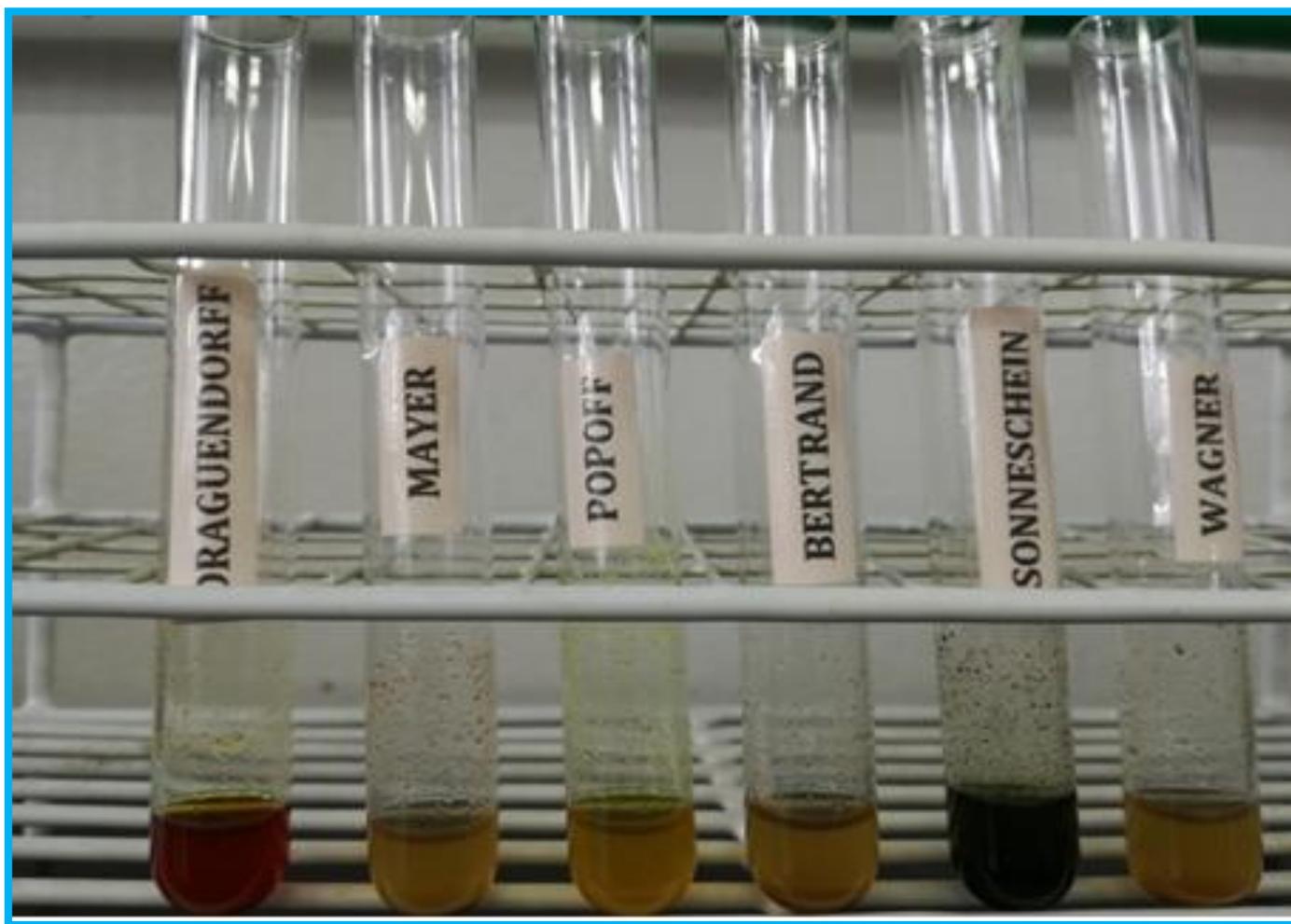


Figura 25. Reconocimiento de alcaloides del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle"

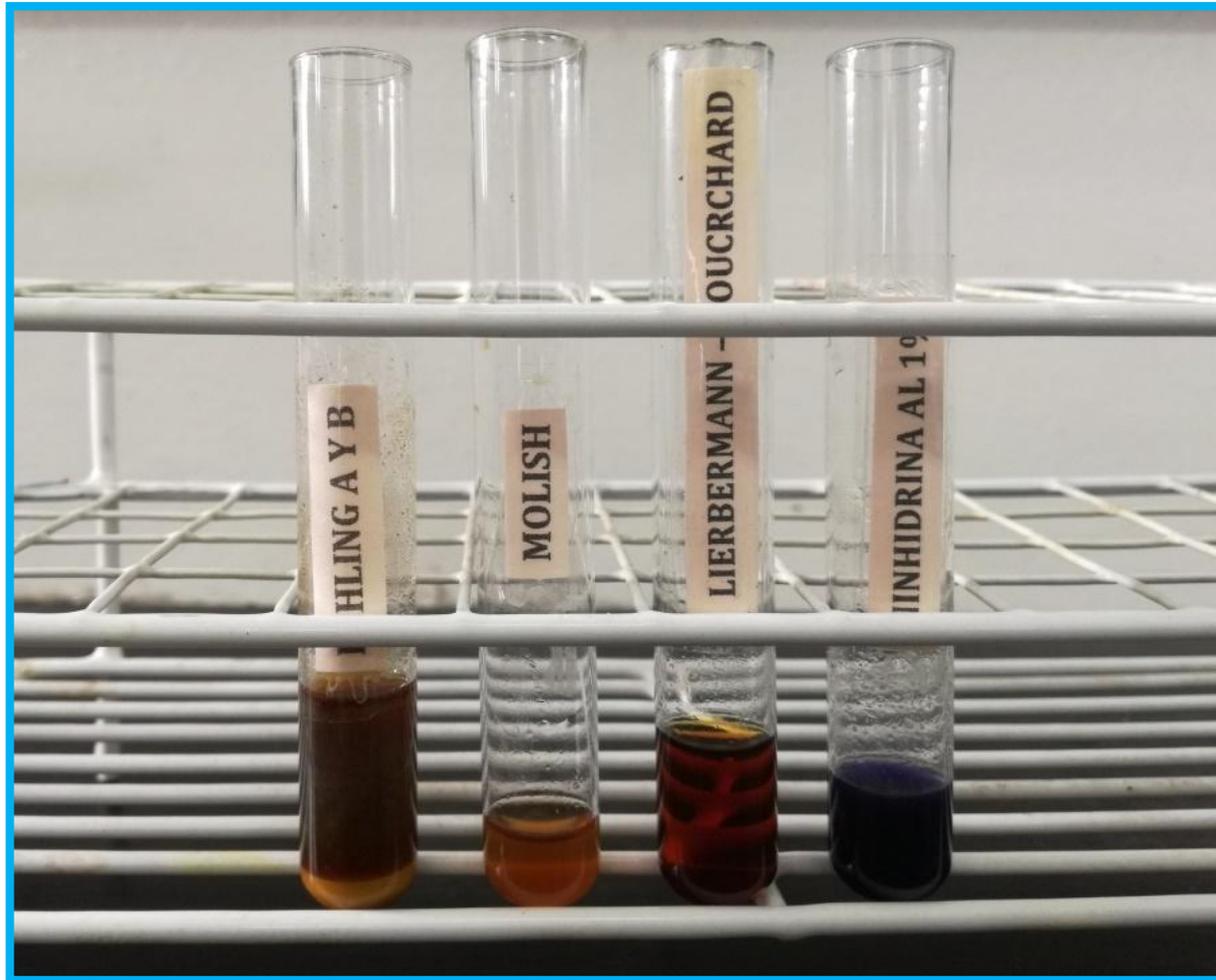


Figura 26. Identificación de metabolitos presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”

4.3. ACTIVIDAD MICROBIANA

4.3.1. Medición del diámetro de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano

Para la medición de los halos se utilizó el instrumento vernier “Caliper”. Se verificó cada una de las fichas para evitar errores u omisiones en los datos que pudieran perjudicar la investigación.

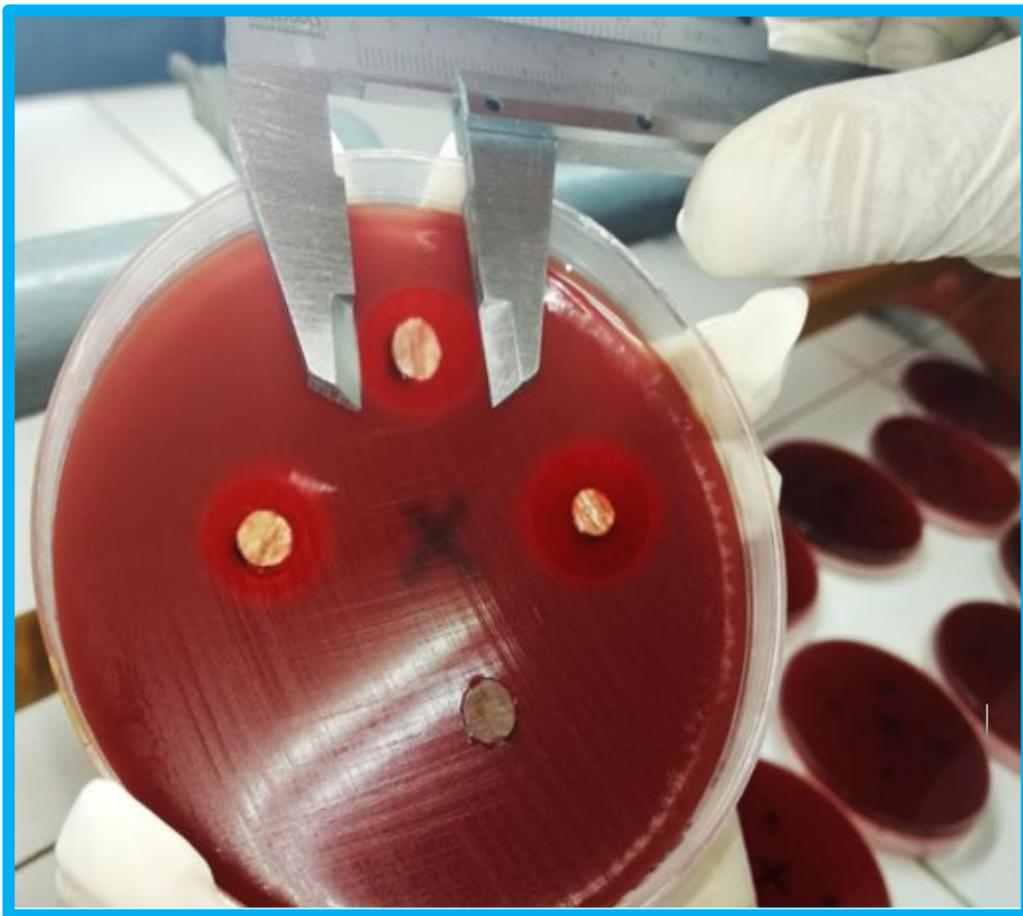


Figura 27. Medición de los halos de inhibición con el instrumento vernier “Caliper”

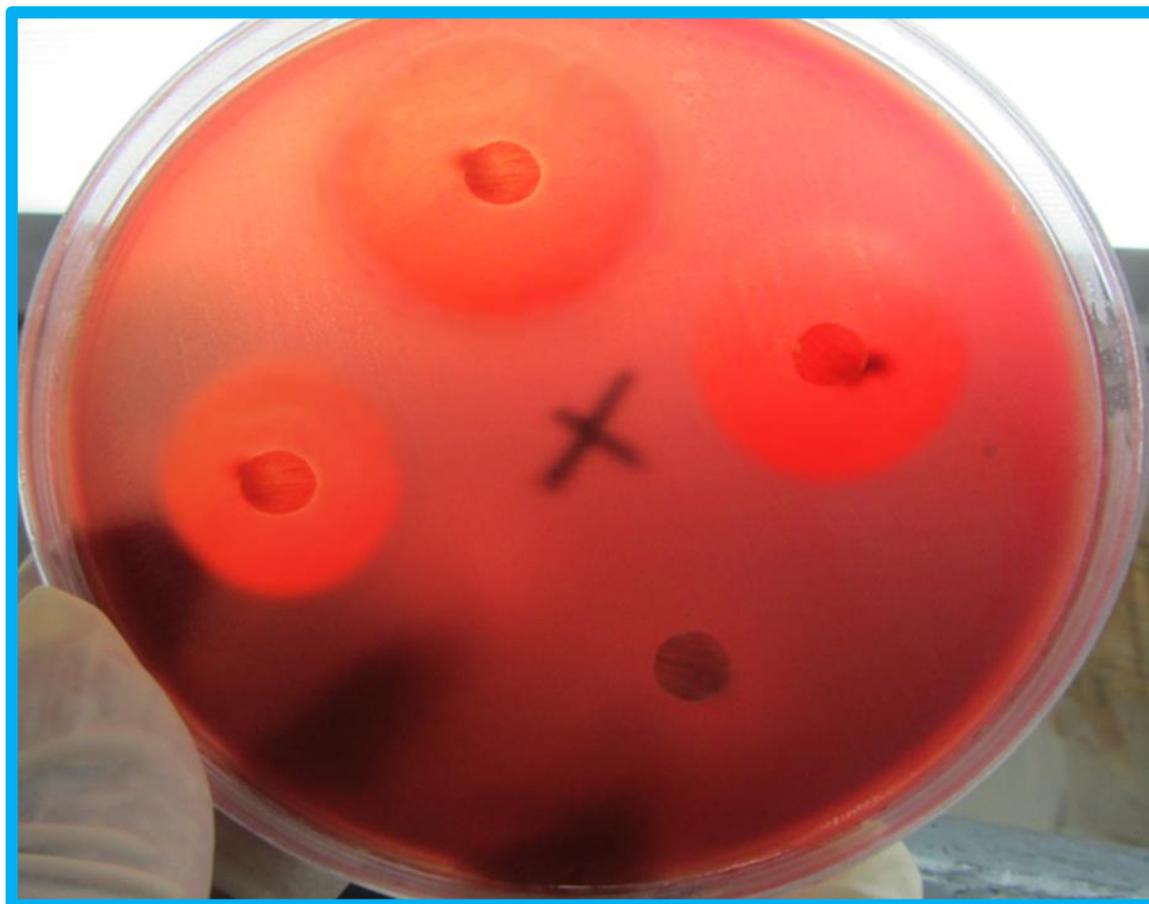


Figura 28. Halos de inhibición de gluconato de clorhexidina al 0,12%, extracto etanólico de *Schinus molle* L. “Molle” al 500 y 1000 mg/mL y agua destilada. A las 48 horas de exposición.



Figura 29. Halos de inhibición de gluconato de clorhexidina al 0,12%, extracto etanólico de *Schinus molle* L. “Molle” al 500 y 1000 mg/mL agua destilada. A las 72 horas de exposición.

4.4. TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se efectuó una ficha de datos en donde se anotaron los resultados del método de difusión en placas con discos de papel filtro. La recolección de los datos se realizó de forma manual y visión directa.

Para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cuantitativa se tomó como referencia los diámetros de halo de inhibición y para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cualitativa se tomó como referencia la escala de Duraffourd (utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición).³¹

1. Nula (-) si es inferior o igual a 8 mm
2. Sensible (Sensible =+) de 9 a 14 mm
3. Muy sensible (muy sensible =++) de 15 a 19 mm
4. Sumamente sensible (S.S=+++)) si fue igual o superior a 20 mm.³¹

4.5. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se realizó el estudio in vitro en la especie bacteriana: *Streptococcus mutans* ATCC 25175, de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle", gluconato de clorhexidina y agua destilada trabajándose 20 repeticiones por cada sustancia a las 48 y 72 horas. Comprobándose sensibilidad de la bacteria mencionada.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas al *Schinus molle* L. "Molle" en estudio han sido agrupados en tablas y gráficos, para la mejor interpretación de los resultados que se detallan a continuación.

4.5.1. Datos estadísticos

Evaluación de la susceptibilidad de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 por método de difusión en placas con discos de papel filtro, impregnados en: Gluconato de clorhexidina 0,12 %, extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL y agua destilada.

Tabla 4. Datos estadísticos de los halos de inhibición de gluconato de clorhexidina 0,12 %, extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL; y agua destilada en 48 y 72 horas

REPETICIÓN	CLORHEXIDINA 0.12 %		SCHINUS MOLLE 1000 mg/mL		SCHINUS MOLLE 500 mg/mL		AGUA	
	48H	72H	48H	72H	48H	72H	48H	72H
	HALOS DE INHIBICION (mm)		HALOS DE INHIBICION (mm)		HALOS DE INHIBICION (mm)		HALOS DE INHIBICION (mm)	
1	16	17	13	14	12	12	0	0
2	17	17	14	14	13	13	0	0
3	15	16	14	14	13	13	0	0
4	17	17	13	14	13	13	0	0
5	16	17	12	13	12	13	0	0
6	15	16	14	14	11	12	0	0
7	16	16	12	13	11	12	0	0
8	16	16	13	13	12	13	0	0
9	18	18	14	14	11	12	0	0
10	17	17	13	14	12	13	0	0
11	15	16	12	13	13	13	0	0
12	15	16	13	13	13	13	0	0
13	17	17	13	13	12	12	0	0
14	17	17	14	14	11	12	0	0
15	18	18	13	13	12	12	0	0
16	18	18	13	13	12	12	0	0
17	17	17	14	14	13	13	0	0
18	16	16	12	13	13	13	0	0
19	17	17	12	13	13	13	0	0
20	18	18	14	14	12	13	0	0

MEDIA	16,55	16,85	13,1	13,5	12,2	12,6	0	0
DES. STAN	1,05006	0,7452	0,78807	0,512989	0,767772	0,502625	0	0

En la **Tabla 4**. Se presenta las medidas de los halos de inhibición ante las sustancias empleadas en el estudio, frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, mediante el método de difusión en disco en milímetros, para efectos del trabajo estadístico para cada grupo de sustancias se determinó el valor de la media, desviación típica.

4.5.1.1. Media de halos de inhibición a las 48 horas

La siguiente figura describe la distribución de las medias de halos de inhibición en base al efecto del gluconato de clorhexidina al 0,12 %, extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” a concentraciones de 500 y 1000 mg/mL; y agua destilada empleados en el estudio frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. A las 48 horas.

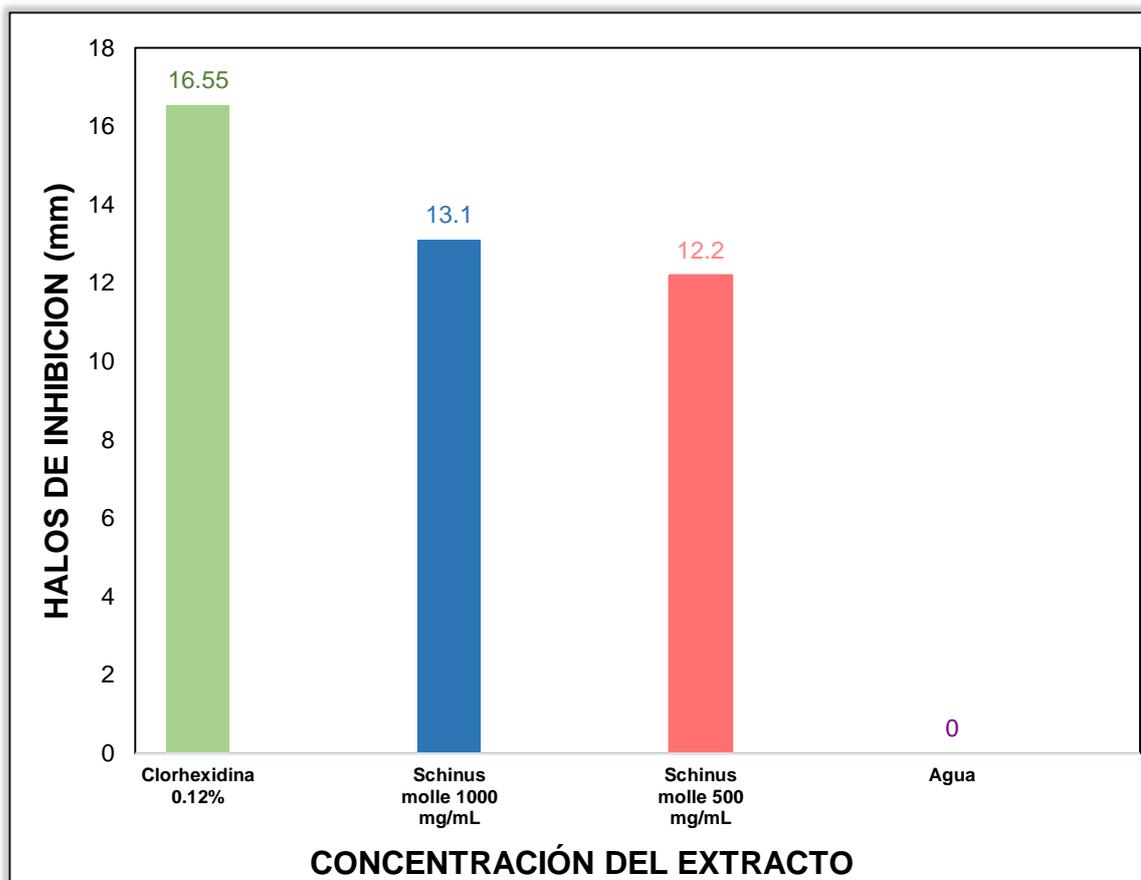


Figura 30. Media de halos de inhibición a las 48 horas

En la **figura 30**. Se muestra la media de los halos de inhibición producido por las sustancias en estudio a las 48 horas frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, provocando una tendencia superior de gluconato de clorhexidina al 0,12 % con una media de 16,55 mm, seguido del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. al 1000 mg/mL presentado una media de 13,10 mm, extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. al 500 mg/mL con 12,20 mm y agua destilada con 0 mm.

4.5.1.2. Media de halos de inhibición a las 72 horas

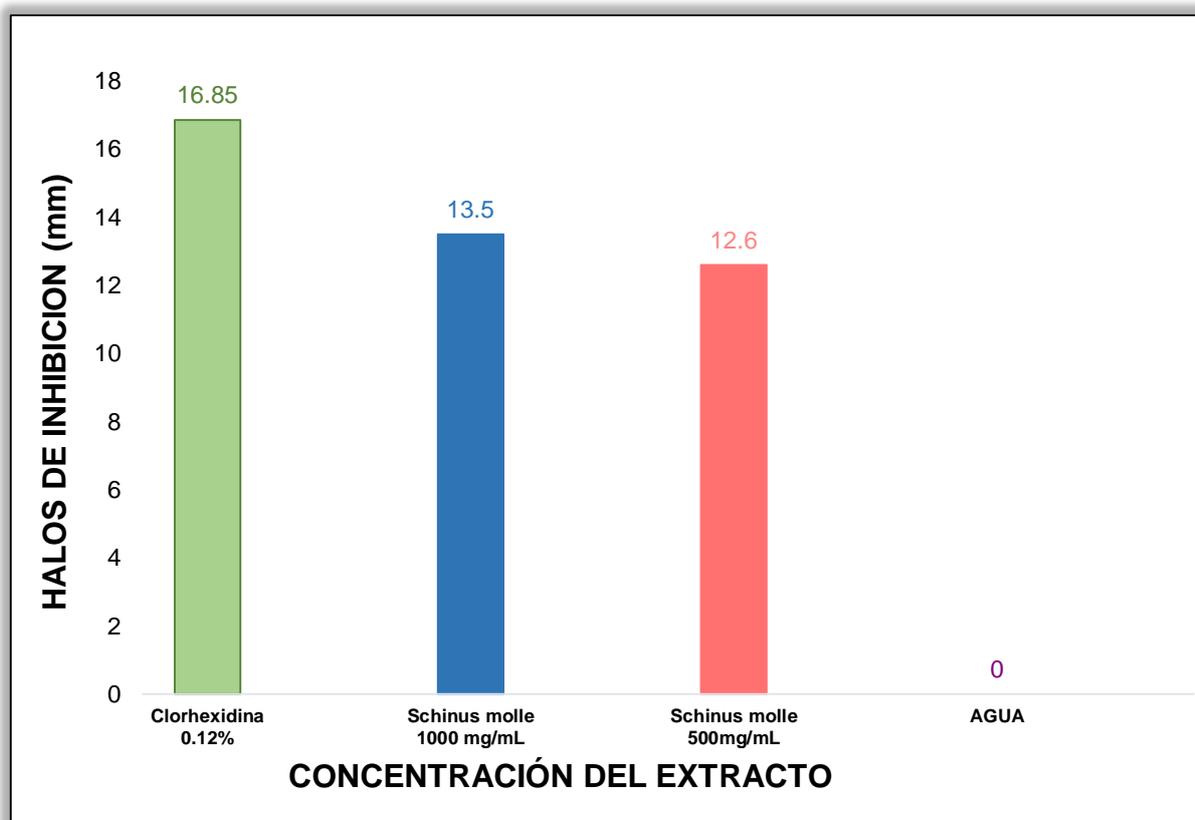


Figura 31. Media de halos de inhibición a las 72 horas

En la **figura 31**. Se muestra la media de los halos de inhibición producido por las sustancias en estudio a las 72 horas frente a la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, provocando una tendencia superior de gluconato de clorhexidina al 0,12 % con una media de 16,85 mm, seguido del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. al 1000 mg/mL presentando una media de 13,50 mm, extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. al 500 mg/mL con 12,60 mm y agua destilada con 0 mm.

4.5.1.3. Grado de sensibilidad según Duraffourd a las 48 y 72 horas.

Determinar el grado de sensibilidad de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 frente a las sustancias en estudio a distintas concentraciones en 48 y 72 horas de exposición.

Tabla 5. Grado de sensibilidad según pautas de Duraffourd.³¹

GRADOS DE SENSIBILIDAD DURAFFOURD					
Sustancias	Tiempo de exposición	Sensibilidad nula menos de 8 mm.	Sensible entre 9 a 14 mm.	Muy sensible entre 15 y 19 mm.	Sumamente sensible de 20 mm a más.
Gluconato de clorhexidina 0,12 %	48 HORAS			16,55	
Extracto <i>Schinus molle</i> L 500 mg/mL	48 HORAS		12,2		
Extracto <i>Schinus molle</i> L 1000 mg/mL	48 HORAS		13,1		
Agua (control negativo)	48 HORAS	0			
Gluconato de clorhexidina 0,12 %	72 HORAS			16,85	
Extracto <i>Schinus molle</i> L 500 mg/mL	72 HORAS		12,6		
Extracto <i>Schinus molle</i> L 1000 mg/mL	72 HORAS		13,5		
Agua (control negativo)	72 HORAS	0			

En la **tabla 5** se observa el análisis cualitativo según las pautas de Duraffourd que indican el grado de sensibilidad de las sustancias empleadas según el tiempo de exposición, donde se mostró que dentro de los rangos de sensibilidad de 9 mm a 16 mm (sensible y muy sensible), el extracto de *Schinus molle* L al 500 y 1000 mg/mL y el gluconato de clorhexidina al 0,12 % no tiene una significativa diferencia, debido a que se encuentran separadas por distancia de medias de halos de inhibición muy cortos podemos concluir que el grado de sensibilidad entre dos sustancias de estudios es similar en cuanto a sus características cualitativas.

4.5.2. Análisis de datos

Se utilizó el programa SPSS® 22 , programa estadístico que permitió obtener referencias y cálculos estadísticos, utilizando estadística no paramétrica bajo pruebas de normalidad Kolmogorov - Smirnov y Shapiro – Wilk.

Tabla 6. Pruebas de normalidad Kolmogorov - Smirnov y Shapiro – Wilk de las muestras en estudio obtenido de SPSS® versión 22

Pruebas de normalidad ^{b,c}						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.*	Estadístico	Gl	Sig.*
Gluconato de clorhexidina 0,12 % 48 HORAS	0,216	20	0,015	0,880	20	0,018
Extracto <i>Schinus molle</i> L. 1000 mg/mL 48 HORAS	0,223	20	0,010	0,809	20	0,001
Extracto <i>Schinus molle</i> L. 500 mg/mL 48 HORAS	0,251	20	0,002	0,800	20	0,001
Gluconato de clorhexidina 0,12 % 72 HORAS	0,230	20	0,007	0,809	20	0,001
Extracto <i>Schinus molle</i> L. 1000 mg/mL 72 HORAS	0,335	20	0,000	0,641	20	0,000
Extracto <i>Schinus molle</i> L. 500 mg/mL 72 HORAS	0,387	20	0,000	0,626	20	0,000

*p<0,05

La **Tabla 6.** Se muestra la prueba de Shapiro-Wilk, donde se tiene que los valores de significancia son menores que 0,05 (95 % de confiabilidad), por ello se rechaza hipótesis nula (Ho) para todas las muestras debido a que menciona que las muestras proceden de poblaciones con la misma distribución de probabilidad (Medias similares), por lo tanto se toma la hipótesis alternativa (Ha) donde ninguna de las sustancias proviene de una población con distribución normal.

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación de tipo experimental in vitro se buscó comprobar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”, para ello se realizó concentraciones de 500 y 1000 mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L, gluconato de clorhexidina al 0,12 % como control positivo y agua destilada como control negativo sobre *Streptococcus mutans* “ATCC 25175”, basándonos en estudios de Rivadeneira D. (2015)¹⁰ donde determinó que el aceite esencial de *Schinus molle* L. presenta efecto antimicrobiano ante cepas de *Streptococcus mutans* .

En la **tabla 2** de la prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”, se observó que la muestra es soluble en agua destilada, etanol y metanol por lo que se deduce que los componentes químicos son de estructura y naturaleza polar, cabe señalar que estos resultados coinciden con los parámetros descritos por la Autora Olga Lock de Ugaz “Investigación Fitoquímica”.³²

La **Tabla 3** muestra los resultados del análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”, donde se encontró la presencia de diferentes metabolitos como: flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, esteroides y/o triterpenos, carbohidratos totales y azúcar reductores, resultados similares fueron encontrados por Herrera N. (2013)⁸ quien trabajó con la corteza y hojas de *Schinus molle* L. “Molle”.

Según Herrera N. (2013)⁸ la actividad antimicrobiana de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle”, se debe a que los flavonoides son pigmentos vegetales que posee un esqueleto carbonado, tiene actividad antimicrobiano debida probablemente a su habilidad para formar complejos con las proteínas solubles y extracelulares y complejo con la pared bacteriana, y los alcaloides, constituyen un grupo heterogéneo de bases nitrogenadas, la mayoría contiene un anillo aromático y su efecto antimicrobiano puede estar relacionado con la capacidad que presenta para inhibir la biosíntesis de ácidos nucleicos.

En la presente investigación se trabajó con cepa estándar de *Streptococcus mutans* principal bacteria implicada en el proceso de caries dental coincidente con el estudio realizado por Huertas M. (2015)³³ donde evidencia que existe un gran número de métodos para determinar el efecto antibacteriano dentro de los cuales el más utilizado es el de difusión en agar. Esta técnica está basada en el método de Kirby-Bauer que se puede realizar a través de discos. El método de difusión en agar con discos se realiza utilizando el papel filtro Whatman .

Se utilizó una suspensión bacteriana de *Streptococcus mutans* en una concentración que se ajustó de acuerdo con el Standard de McFarland 0,5 y esto garantizó que la cantidad de bacterias inoculadas en cada placa sea la misma.⁸

En los datos obtenidos según se muestra en la **tabla 4** indican la evidencia acción antimicrobiana que presenta el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175 donde las medias inhibitorias de concentración más altas a las 48 y 72 horas fueron por el gluconato de clorhexidina al 0,12 % a 16,55 mm y 16,85 mm respectivamente, seguida del extracto etanólico de *Schinus molle* al 1000 mg/mL con una media de inhibición a las 48 y 72 horas de 13,1 mm y 13,5 mm respectivamente, según Herrera N. (2013)⁸ observó que a medida que aumentan las concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. “Molle” aumenta el diámetro del halo de inhibición de crecimiento de *Streptococcus*. Sin embargo es necesario tener en cuenta que la composición de los extractos vegetales pueden variar incluso dentro de una misma especie debido a la localización geográfica, estado de crecimiento de la planta y condiciones de siembra.

En la **tabla 5**, indican el grado de sensibilidad de las sustancias empleadas según las pautas de Duraffourd, donde se mostró que el extracto de *Schinus molle* L. al 500 y 1000 mg/mL presentan un grado de sensibilidad de 9mm a 14 mm (sensible) y el gluconato de clorhexidina al 0,12 % tiene un grado de sensibilidad de 15 a 19 mm (muy sensible), no tiene una significativa diferencia, debido a que se encuentran separadas por distancia de medias de halos de inhibición muy cortos. La utilización de este análisis se basó en el estudio de Rivadeneira D. (2015)¹⁰ que estudió el potencial biosida del aceite esencial de *Schinus molle* L.

“Molle” frente al gluconato de clorhexidina al 0,12 % sobre *Streptococcus mutans*, usando los parámetros de Duraffourd, encontrando diversa actividad antimicrobiana.

No se halló halos de inhibición mayor a 20 mm; rango correspondiente, según Duraffourd, al valor (sumamente sensible), ya que extracto de *Schinus molle* L. a 1000 mg/mL se obtuvo como promedio 13,5 mm en 72 horas, lo que equivale en la escala de Duraffourd (sensible), a diferencia del estudio de Herrera N. (2013)⁸ donde determinaron halos de inhibición mayores a 20 mm en concentración de 1000 mg/mL.

VI. CONCLUSIÓN

Se comprobó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” y sus concentraciones de 1000 mg/mL, con una media de 13,1 a 13,5 mm, de 500 mg/mL con una media de 12,2 mm a 12,6 mm, y gluconato de clorhexidina al 0,12%, con una media de 16,55 mm y 16,85 mm, a las 48 y 72 horas de exposición respectivamente.

En el análisis cualitativo del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” se comprobó la presencia de los siguientes componentes químicos como flavonoides, alcaloides, esteroides y/o triterpenos, carbohidratos totales y azúcares reductores.

Se determinó la acción antimicrobiana que presenta el extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “Molle” al 500 y 1000 mg/mL, se comprueba que posee similar acción antimicrobiana como el gluconato de clorhexidina al 0,12 % que se encuentra en la industria farmacéutica.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda la utilización de este estudio como base para futuras investigaciones en cuanto al estudio fitoquímico, componentes y concentraciones que permitan establecer el uso de los efectos antimicrobianos que poseen las hojas de *Schinus molle* L. "Molle", ante productos químicos.

Se debe valorar el uso que se ha dado a la especie vegetal *Schinus molle* L. "Molle", por nuestros antepasados en el campo medicinal, por lo tanto se recomienda la utilización de la misma para el tratamiento antimicrobiano en el área Farmacéutica desde una perspectiva médica alternativa, enfocada principalmente a regiones rurales donde el uso de medicamentos es escaso, por las condiciones geográficas o económicas.

Se recomienda la utilización del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. "Molle" como principio activo para la elaboración de colutorio bucal siendo esta una alternativa natural.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Lagos E. Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis. [Tesis Pregrado] Tacna, Perú: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2012.
2. Chirino M, Carriac M, Ferrero A. Actividad insecticida de extractos crudos de drupas de *Schinus molle* L. “Anacardiaceae” sobre larvas neonatas de *Cydia Pomonella* L. Universidad Nacional del Sur de Bahía Blanca. [Internet].2001 [citado el 10 de enero de 2017]. Disponible en:<http://www.mapama.gob.es /ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-27-03-305-314.pdf>
3. Hernández L. Actividad inhibitoria letal de los extractos de ajo para *Escherichia coli* y *L. Innocua*. [Tesis Pregrado] Puebla, México: Universidad de las Américas Puebla; 2012. [Internet]. 2012 [citado el 11 de enero de 2017].Disponible en:<http://catarina.udlap.mx/udla/tales/documentos/lia/hernandezpld/portada.html>
4. Pamo O. Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. Rev Perú Med Exp Salud Pública .2009; 26(3):23.
5. Sarmiento L. Efecto antibacteriano del extracto alcohólico y del extracto acuoso de Té verde *Camellia sinensis* sobre bacterias orales de importancia Estomatológica , *Streptococcus mutans* ,*Streptococcus mitis* y *Streptococcus salivarius*. [Tesis Pregrado] Arequipa, Perú: Universidad Alas Peruana; 2010.

6. Le-Gales C. Informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales. [Internet].2004 [citado el 10 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/>
7. Calcina K, Ortiz Y. Estudio de flavonoides en el fruto de *Schinus molle* L. "Molle". [Tesis Pregrado] Lima, Perú: Universidad Privada Norbert Wiener; 2013.
8. Herrera N. Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas de *Schinus molle* L. "molle" sobre la viabilidad de *Streptococcus β -hemolítico* "in vitro" [Tesis Pregrado].Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
9. Centurión K. Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668 [Tesis Progrado] trujillo, Perú: Universidad Privada Antenor Orrego; 2015.
- 10.Rivadeneira D. Potencial Biosida del Aceite Esencial de *Schinus molle* L. (molle) frente al gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre *Streptococcus mutans*, principal agente cariogénico [Tesis pregrado]. Quito, Ecuador: Universidad central del Ecuador; 2015.
11. Rueda M. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de propóleo ecuatoriano vs gluconato de clorhexidina contra *streptococcus mutans*. [Tesis pregrado]. Quito, Ecuador: Universidad central del Ecuador; 2015.
12. Yueqin Z. Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias. Universidad de Valencia. [Internet]. 2006 [citado el 11 de diciembre de 2016]. Disponible en: http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UV/AVAILABLE/TDX0403108115541//yueqin.pdf

13. Zegarra G. Actividad repelente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales y tarwi [Tesis de licenciatura]. Lima, Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2010.
14. Madrid G. El fruto de *Schinus molle* L. su interés bromatológico en la elaboración de la llamada chicha de molle [Tesis pregrado]. Lima, Perú: Universidad Nacionalidad Mayor de San Marcos; 1992.
15. Sistema Nacional de Información Forestal *Schinus molle* L. [Internet]. 2010 [citado el 11 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/infoespecies/arboles/doctos/3-anaca4m.pdf>
16. Carrete R. Anacahuita (*Schinus molle* L.) Grupo guayubura. [Internet]. 2012 [citado el 11 de diciembre de 2016]. Disponible de <http://www.rapaluruaguay.org/organicos/articulos/anacahuita.pdf>.
17. Carrasco R. Estudio de los aceites y determinación de la actividad antimicrobiana del fruto de *Schinus molle* L [Tesis de Maestría]. Lima; Perú: Universidad Nacionalidad Mayor de San Marcos; 1998.
18. Viturro C. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana. 2^{da} Ed. Brasil; [Internet]. 2010 [citado el 12 de diciembre 2016]. Disponible en: <http://www.pucrs.br.edipucrs>
19. Jimenez C, Cuevas E. Flavonoides y sus acciones antioxidantes. [Internet]. 2009 [Citado el 27 de enero 2017] Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
20. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2^{da}. Ed. Zaragoza : Acribia S.A ; 2001.

21. Martinez S, Gonzales J, Culebras J. Los flavonoides; propiedades y acciones antioxidantes. Universidad de León, España. [Internet] 2002 [citado el 10 de enero 2017] Disponible en: <http://www.aulamedica.es/gdcr/index.php/nh/article/view/3338/3338>
22. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1^{ra}. Ed. Barcelona: Omega S.A; 2000.
23. Martinez M. Flavonoides. Universidad de Antioquia Medellin. [Internet].2005 [Citado el 27 de enero 2017] Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/ff/flavonoides2001.pdf>
24. Transito L. Flavonoides. Fitoterapia, Ámbito farmacéutico. Vol;21. Num 04. [Internet].2002 [Citado el 28 de enero 2017] Disponible en: file:///C:/Users/USER/Downloads/13028951_S300_es.pdf
25. Ruiz M, Susunaga C. Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaruba* y *Bursera graveolens* "BURSERACEAS", frente a microorganismo como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Ervinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *trichoderma viride* y *Botrytis cinérea*. [Tesis Pregrado] Bogotá, Colombia: Pontifica Universidad Javeriana; 2000.
26. Lizcano A, Vergara J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Herperomeles furruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismo patógenos y fitopatógenos. [Tesis Pregrado] Bogotá, Colombia: Pontifica Universidad Javeriana; 2008.
27. Figueroa M, Alonso G. Microorganismos presentes en las diversas etapas de la progresión de caries dental. Acta odontológica.Venezuela;2009 .p.113

28. Liébana J. Microbiología Oral .2^{da} Ed. Madrid: Graw Hill Interamericana; 1997. p. 565
29. Gutiérrez S. Fundamento de ciencias básicas aplicadas a la odontología .1^{ra} Ed. Bogotá; 2006 .p. 379
30. Morante S. Valoración cruzada y a doble ciego, mediante el modelo de gingivitis experimental de la eficacia de tres colutorios de Clorhexidina sin alcohol frente a la prevención de gingivitis y a la neoformación de placa supragingival [Tesis Doctoral]. Madrid. España. Universidad Complutense de Madrid; 2003
31. Duraffourd C, Hervicourt L, La praz JC. Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1^o edición. París: Masson SA; 1983
32. Lock de Ugaz, O. Investigación fitoquímica- Métodos en el estudio de Productos Naturales, 2^{da}.Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú, fondo Editorial, 1994.
33. Huertas M. (2015) .Evaluación in vitro del efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de *Physalis peruviana* (capulí) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) [Tesis pregrado]. Lima, Perú: Universidad peruana de ciencias aplicadas; 2015.

ANEXOS 1.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año de la Consolidación del Mar de Grau"

CONSTANCIA N° 216-USM-2016

EL JEFE (E) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Claudia Elizabeth CLEMENTE SOTTECCANI** y **Rosmery PAUCAR LOPEZ**, estudiantes de la Universidad Privada NORBERT WIENER ha sido estudiada y clasificada como: ***Schinus molle* L.**, tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ROSIDAE

ORDEN: SAPINDALES

FAMILIA: ANACARDIACEAE

GENERO: Schinus

ESPECIE: *Schinus molle* L.

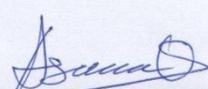
Nombre vulgar: molle

Determinado por: Asunción Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Fecha, 05 de octubre de 2016




Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)