



**Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Escuela Académico Profesional de Farmacia  
y Bioquímica**

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UN  
COLUTORIO A BASE DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Eucalyptus  
globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña), frente a  
*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC  
29737 y *Candida albicans* ATCC 10231.**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

**Presentado por:**

Bach. AYLAS CANICELA ROOSEVELT EDHAIR

**Asesor:**

MSc. Jorge Jonathan Nué Martinez

**Lima – Perú**

**2017**

## **DEDICATORIA**

A mi mamita Celinda Bueno Baldeón, por su cariño, ayuda y comprensión.

A mi mamá Silvia Canicela Bueno, por estar conmigo en todo momento y darme todo su cariño.

A mi papá Roosevelt Aylas Osoreo, por su disciplina y ejemplo de perseverancia.

A kally Rosales Andrade, por su cariño, consejos y ayuda a nunca rendirme a pesar de las dificultades de la vida.

## **AGRADECIMIENTO:**

A Dios, por darme salud, guiarme por el camino de lo correcto y permitirme llegar a este momento tan especial.

A mi mamita Celinda, a mis padres y a mis seres queridos, por estar conmigo en todo momento y brindarme su cariño, compañía y buenos deseos.

A la Doctora María Alina Ratto, por ser un ejemplo de profesional exitoso y gran conocedora de la microbiología.

Al Doctor Enrique León Soria, por ser un ejemplo de buen catedrático, amigo y guía profesional.

A mi maestra de microbiología, la Q.F. Teresa Gallardo Jugo, por guiarme en el arte y ciencia de las técnicas microbiológicas

A mi asesor el MSc. Jorge Jonathan Nué Martínez, por su paciencia y ayuda incondicional en el desarrollo de mi tesis.

A la Bióloga Milagros Rodríguez Flores, por su cariño, enseñanzas y sabios consejos.

A la Bióloga Eliana Benedetti, por su gran ayuda en la estructuración de este trabajo de investigación.

A la Bióloga Luisa Arismendiz Sánchez, por su amistad incondicional.

# INDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Situación problemática</b>	<b>2</b>
1.1.1. Problema general	3
<b>1.2. Justificación e importancia</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Objetivos General y específicos</b>	<b>3</b>
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivo específico	3
<b>1.4. Hipótesis</b>	<b>4</b>
1.4.1. Hipótesis general	4
<b>1.5. Variables</b>	<b>4</b>
<b>1.6. Delimitación</b>	<b>4</b>
1.6.1. Limitaciones	4
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>5</b>
<b>2.1. Antecedentes de la investigación</b>	<b>5</b>
2.1.1. Estudios a nivel internacional	5
2.1.2. Estudios a nivel nacional	7
<b>2.2. Teorías generales</b>	<b>12</b>
2.2.1. Aceites esenciales	12
2.2.1.1 Características	12
2.2.1.2 Distribución	12
2.2.1.3 Localización	13
2.2.1.4 Función en el vegetal	13
2.2.1.5. Métodos de obtención	14
2.2.1.5.1. Arrastre con vapor de agua	14
2.2.1.5.2. La hidrodestilación simple o destilación con agua.	14
2.2.1.5.3. Destilación con vapor saturado o destilación con agua y vapor.	14
2.2.1.5.4. La destilación con vapor seco o sobrecalentado.	15
2.2.1.5.5. Fundamentos de la destilación por arrastre con vapor de agua.	15
2.2.1.5.6. Expresión	16
2.2.1.6. Factores de variabilidad de los aceites esenciales	17
2.2.1.7. Existencia de Quimiotipos	17
2.2.1.8. Influencia del ciclo Vegetativo	17
2.2.1.9. Influencia de los factores extrínsecos	18
2.2.1.10. Influencia del proceso de obtención	18
2.2.2. Eucalyptus globulus Labill (Eucalipto)	19
2.2.2.1. Clasificación sistemática	19
2.2.2.2. Descripción botánica	20
2.2.2.3. Hábitat y Distribución	20

2.2.2.4. Usos tradicionales	20
2.2.2.5. Toxicidad	20
2.2.2.6. Composición química del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus Labill</i>	21
2.2.2.7. Acción farmacológica del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus Labill</i>	21
2.2.3. <i>Minthostachys sp.</i> (muña)	22
2.2.3.1. Clasificación sistemática	22
2.2.3.2. Descripción	22
2.2.3.3. Características botánicas	23
2.2.3.4. Metabolitos presentes en <i>Minthostachys sp.</i>	24
2.2.3.5. Tipos de <i>Minthostachys</i>	25
2.2.4. Colutorios	25
2.2.4.1. Definición	25
2.2.4.2. Importancia	25
2.2.4.3. Indicaciones y función de los colutorios	26
2.2.4.4. Componentes activos de los colutorios	27
2.2.4.5. Presencia de alcohol en los colutorios	28
2.2.4.6. Colutorios que contienen alcohol y su relación con el Cáncer oral	28
2.2.5. Microbiología oral	29
2.2.5.1. Ecosistemas orales	29
2.2.5.2. Mucosa	29
2.2.5.3. Superficies dentales, película adquirida y placa.	30
2.2.5.3.1. Superficies dentales	30
2.2.5.3.2. Película adquirida	30
2.2.5.3.3. Placa dental	30
2.2.5.4. Saliva	30
2.2.5.5. Naturaleza de la microbiota oral.	31
2.2.5.5.1. Cocos grampositivos	31
2.2.5.5.2. Cocos gramnegativos	31
2.2.5.5.3. Bacilos grampositivos	31
2.2.5.5.4. Bacilos gramnegativos	32
2.2.5.5.5. Otros microorganismos	32
2.2.5.6. Determinantes ecológicos orales	32
2.2.5.6.1. Factores Físicoquímicos	32
2.2.5.6.1.1. Humedad	33
2.2.5.6.1.2. pH	33
2.2.5.6.1.3. Temperatura	34
2.2.5.6.2. Factores Nutricionales	34
2.2.5.6.3. Acción antimicrobiana	35
2.2.5.6.4. Acción inmunitaria	36
2.2.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	37
2.2.6.1. Características	37
2.2.6.2. Aislamiento e Identificación	37
2.2.6.3. Patogenicidad Odontológica	38
2.2.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.2.7.1. Características	38
2.2.7.2. Aislamiento e identificación	39
2.2.7.3. Patogenicidad odontológica	40
2.2.8. <i>Candida albicans</i>	40

2.2.8.1. Características _____	40
2.2.8.2. Aislamiento e identificación _____	41
<b>III. DISEÑO METODOLOGICO _____</b>	<b>43</b>
<b>3.1. Tipo de estudio _____</b>	<b>43</b>
<b>3.2. Muestra _____</b>	<b>43</b>
<b>3.3. Procedimiento _____</b>	<b>44</b>
3.3.1. Obtención del aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus Labill</i> (Eucalipto) y <i>Minthostachys sp.</i> (Muña) _____	44
3.3.1.1. Recolección de las especies vegetales _____	44
3.3.1.2 Identificación taxonómica. _____	44
3.3.1.3 Obtención del aceite esencial _____	44
3.3.2 Obtención de los microorganismos de prueba. _____	45
3.3.2.1 Activación de las cepas ATCC _____	45
3.3.3. Formulación del colutorio a base de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus globulus Labill</i> (Eucalipto) y <i>Minthostachys sp.</i> (Muña) _____	45
3.3.4. Preparación del colutorio a base de los aceites esenciales de <i>Eucalyptus globulus Labill</i> (Eucalipto) y <i>Minthostachys sp.</i> (Muña) _____	45
3.3.5. Evaluación de la efectividad antimicrobiana del colutorio por el Método Reto Microbiano Modificado _____	46
3.3.5.1. Principio del ensayo _____	46
3.3.5.2. Procedimiento del método de ensayo _____	46
3.3.5.3. Calculo del porcentaje de reducción _____	47
Se realiza aplicando la siguiente fórmula: _____	47
<b>B = Cuenta obtenida _____</b>	<b>47</b>
<b>3.4. Procesamiento de datos _____</b>	<b>47</b>
<b>3.5. Análisis de datos _____</b>	<b>47</b>
<b>IV. RESULTADOS _____</b>	<b>48</b>
<b>V. DISCUSION _____</b>	<b>57</b>
<b>VI. CONCLUSIONES _____</b>	<b>59</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES _____</b>	<b>60</b>
<b>VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA _____</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS _____</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Extracción del aceite esencial del eucalipto.	Pg. 71
<b>Figura 2.</b> Extracción del aceite esencial de la muña.	Pg. 72
<b>Figura 3.</b> Purificación de los aceites esenciales de eucalipto y muña.	Pg. 72
<b>Figura 4.</b> Preparación del material de vidrio estéril para el análisis.	Pg. 73
<b>Figura 5.</b> Preparación del material descartable estéril para el análisis.	Pg. 73
<b>Figura 6.</b> Incorporación del agar a las placas petri.	Pg. 74
<b>Figura 7.</b> Homogenización del agar en las placas petri.	Pg. 74
<b>Figura 8.</b> Incubación de las placas petri.	Pg. 75
<b>Figura 9.</b> Recuento Inicial de <i>Staphylococcus aureus</i>	Pg. 75
<b>Figura 10.</b> Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> enfrentado al colutorio.	Pg. 75
<b>Figura 11.</b> Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> enfrentado al control positivo.	Pg. 76
<b>Figura 12.</b> Recuento inicial de <i>Candida albicans</i> .	Pg. 76
<b>Figura 13.</b> Recuento de <i>Candida albicans</i> enfrentada al colutorio.	Pg. 76
<b>Figura 14.</b> Recuento de <i>Candida albicans</i> enfrentada al control positivo.	Pg. 77
<b>Figura 15.</b> Recuento inicial de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Pg. 77
<b>Figura 16.</b> Recuento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> enfrentada al colutorio.	Pg. 77
<b>Figura 17.</b> Recuento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> enfrentada al control positivo.	Pg. 78

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Grafico 1.</b> Gráfico de análisis de normalidad para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pg. 49
<b>Grafico 2.</b> Gráfico de prueba de igualdad de varianza para <i>Klebsiella pneumoniae</i> con ambos tratamientos. (Minitab)	Pg. 50
<b>Grafico 3.</b> Gráfico de diagnóstico de supuestos para <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	Pg. 50
<b>Grafico 4.</b> Intervalos de reducción de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en reducción de porcentaje y reducción logaritmica (R-Project)	Pg. 52
<b>Grafico 5.</b> Gráfico de diagnóstico de supuestos para <i>Staphylococcus aureus</i>	Pg. 53
<b>Grafico 6.</b> Intervalos de reducción de <i>Staphylococcus aureus</i> en reducción de bacteriana y reducción logaritmica (R-Project)	Pg. 54
<b>Grafico 7.</b> Gráfico de diagnóstico de supuestos para <i>Candida albicans</i> .	Pg. 55
<b>Grafico 8.</b> Intervalos de reducción de <i>Candida albicans</i> en reducción de levaduras y reducción logaritmica (R-Project)	Pg. 56



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resultados de <i>Staphylococcus aureus</i>	Pg. 48
<b>Tabla 2.</b> Resultados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pg. 48
<b>Tabla 3.</b> Resultados de <i>Candida albicans</i>	Pg. 48
<b>Tabla 4.</b> Estadística descriptiva para <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pg. 49
<b>Tabla 5.</b> Estadística descriptiva para <i>Staphylococcus aureus</i>	Pg. 49
<b>Tabla 6.</b> Estadística descriptiva para <i>Candida albicans</i>	Pg. 49
<b>Tabla 7.</b> Operacionalización de variables	Pg. 67

## **ANEXOS**

<b>ANEXO 1.</b> Materiales y equipos	Pg. 69
<b>ANEXO 2.</b> Ficha de recolección de datos	Pg. 71
<b>ANEXO 3.</b> Procesamiento de extracción de los aceites esenciales.	Pg. 73
<b>ANEXO 4.</b> Evaluación de la efectividad antibacteriana del colutorio por el Método Reto Microbiano Modificado.	Pg. 74

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación titulado “Evaluación de la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto) y *Minthostachys* sp (Muña), frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231”, tuvo como objetivo principal Evaluar la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto) y *Minthostachys* sp. (Muña) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231. El estudio fue cuasi experimental, prospectivo y transversal. Se utilizó una ficha de registro para los datos obtenidos. El método empleado para la evaluación de la efectividad antibacteriana fue el de Reto Microbiano Modificado. Los resultados fueron: para *Klebsiella pneumoniae*, a un nivel de significancia de 0.05 y un p-valor=0.4412, el tratamiento con el colutorio formulado tiene el mismo efecto que colutorio comercial; para *Staphylococcus aureus*, a un nivel de significancia de 0.05 y un p-valor=0.6039, el tratamiento con el colutorio formulado no es más efectivo que el colutorio comercial, ambos presentan la misma efectividad; para *Candida albicans*, a un nivel de significancia de 0.05 y un p-valor=0.0000325, se acepta que el tratamiento con el colutorio formulado presenta mayor efectividad que el colutorio comercial.

**Palabras clave:** Efectividad antibacteriana, colutorio, aceites esenciales, reto microbiano.

## SUMMARY

The present research work entitled "Evaluation of the antimicrobial effectiveness of a mouthwash based on the essential oils of *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalyptus) and *Minthostachys sp* (Muña), against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 and *Candida albicans* ATCC 10231 ", had as main objective to evaluate the antimicrobial effectiveness of a mouthwash based on the essential oils of *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalyptus) and *Minthostachys sp.* (Muña) against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 and *Candida albicans* ATCC 10231. The study was quasi-experimental, prospective and cross-sectional. A registration form was used for the data obtained. The Modified Microbial Challenge method was used to evaluate antibacterial effectiveness. The results were: for *Klebsiella pneumoniae*, at a level of significance of 0.05, treatment with the formulated mouthwash has the same effect as a commercial mouthwash; for *Staphylococcus aureus*, at a level of significance of 0.05, the treatment with the formulated mouthwash is no more effective than the commercial mouthwash, they present the same effectiveness compared to the formulated mouthwash; for *Candida albicans*, at a level of significance of 0.05, it is accepted that the treatment with the formulated mouthwash is more effective than the commercial mouthwash.

**Key words:** Antibacterial effectiveness, mouthwash, essential oils, microbial challenge

## I. INTRODUCCIÓN

La salud bucal es uno de los grandes problemas de salud pública a la que no se le ha dado mucha importancia en nuestro país. La higiene bucal es una adopción de diversos hábitos que ayudan a reducir y eliminar los desechos adheridos a los dientes provenientes de la dieta diaria. Para cumplir con estos hábitos existen diversos productos en el mercado que nos ayudan de diversas formas, como: el cepillo dental, el hilo dental, los dentífricos y el colutorio. El colutorio que es parte del hábito de higiene oral ayuda a controlar y disminuir la carga bacteriana que provocan diversas patologías en la zona bucofaríngea. El colutorio en su formulación habitual contiene altas cantidades de alcohol, que sirve como diluyente de sus principios activos, como conservante y como activo para eliminar microorganismos, pero estas altas concentraciones podría ser perjudiciales para la salud, como se ha mencionado en diversas investigaciones y publicaciones.<sup>1</sup>

Ante esta problemática y en la búsqueda de nuevas alternativas que ayuden a mejorar los productos que se usan en la higiene oral, se centra el interés en las especies vegetales que poseen actividad antimicrobiana. Estas diversas especies vegetales que abundan en nuestro país han contribuido activamente al desarrollo de las diversas poblaciones y a la humanidad. Su utilización como alimento y materia prima para elaborar diversos productos de uso cotidiano o productos utilizados en la medicina ha sido parte de los grandes avances de la humanidad y la terapéutica.

Los aceites esenciales han sido de gran utilidad en la formulación de diversos productos farmacéuticos debido a sus diversas propiedades. Así podemos mencionar a los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña), quienes han demostrado buena actividad antimicrobiana en diversas investigaciones.<sup>2,3</sup> Es por ello que en la presente investigación se formula un colutorio que tiene como activos a los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña), sin la presencia de alcohol en su formulación y con el objetivo general de evaluar su efectividad antimicrobiana frente a tres cepas que han sido causantes de diversas patologías orales: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.<sup>4,5,6,7</sup>

## 1.1. Situación problemática

Los colutorios desde siempre han sido un aliado perfecto para tratar las afecciones bucales y reducir la concentración de microorganismos presentes en la cavidad oral, estos productos son formulaciones que se han convertido en el complemento ideal para llegar a las zonas de más difícil acceso y poder permitir a los principios activos actuar por más tiempo.

En los últimos años se han publicado diversas investigaciones sobre el uso de los colutorios con alcohol, se menciona que: “La elevada cantidad de alcohol en algunos colutorios, así como el hecho que permanecen en contacto con la mucosa oral durante más tiempo que una bebida alcohólica, puede hacer pensar en un efecto nocivo a partir de un mecanismo local. El enjuague oral aumenta el tiempo de exposición de la mucosa al alcohol y se ha demostrado que colutorios con alto contenido en alcohol producen lesiones hiperqueratósicas tanto en hombres como en animales de estudio.”<sup>1</sup>

Teniendo en cuenta esta problemática la presente formulación de un colutorio natural evita el alcohol como uno de sus excipientes. Se propone un producto libre de alcohol y con principios activos naturales como los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) que en diversas investigaciones<sup>2, 3</sup> han demostrado buena actividad antimicrobiana.

En la cavidad oral existen diversos microorganismos algunos parte de la flora normal y otros oportunistas que son los principales responsables de las diversas patologías odontológicas, entre los cuales podemos mencionar: *Klebsiella pneumoniae*, “presente antes y posterior a un procedimiento quirúrgico odontológico”<sup>4</sup>, “es una bacteria muy preponderante en la cavidad oral”<sup>5</sup>; *Candida sp*, “que aparece principalmente en la lengua y el paladar, provocando afecciones bucofaríngeas”<sup>6</sup>; *Staphylococcus aureus*, “puede causar una infección dentaria”<sup>7</sup>.

Controlar el crecimiento o ausencia de estos microorganismos es de suma importancia para tener una buena salud bucal, evitando así patologías odontológicas. Esto se puede lograr con el uso de los diversos métodos de limpieza bucal, como el cepillado, el uso del hilo dental y el uso de un colutorio efectivo frente a estos patógenos.

### **1.1.1. Problema general**

¿Presentará efectividad antimicrobiana el colutorio a base de aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231?

### **1.2. Justificación e importancia**

La presente investigación es de gran interés y utilidad para la sociedad, ya que al demostrarse una buena efectividad antimicrobiana comparable a otro colutorio comercial, este podría sustituir el uso de los colutorios que contienen alcohol, que pueden ser dañinos para la salud de las personas. Además el colutorio propuesto tiene como insumos activos aceites esenciales naturales, extraídos de dos plantas milenarias del Perú. Este podría convertirse en un producto beneficioso y accesible para la población en general y así mejorar la salud bucal de la población peruana.

### **1.3. Objetivos General y específicos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Evaluar la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231.

#### **1.3.2. Objetivo específico**

Comparar los resultados de la efectividad antimicrobiana obtenidos del colutorio a base de aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231 con los resultados de un colutorio comercial.

Determinar la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231.

## **1.4. Hipótesis**

### **1.4.1. Hipótesis general**

El colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) presenta efectividad antimicrobiana comparable con la de un colutorio comercial frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231.

### **1.5. Variables**

Efectividad antimicrobiana

## **1.6. Delimitación**

### **1.6.1. Limitaciones**

En el presente trabajo se determinará la actividad antimicrobiana de un colutorio a base de aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña), pero no se podrá evaluar la actividad antiinflamatoria y cicatrizante del producto, siendo estos de suma importancia para demostrar el gran beneficio que aporta a la salud bucal. No se puede desarrollar estas pruebas por la falta de metodología experimental en cavidad oral y por las restricciones que se presentan si se quisiera realizar un estudio *in vivo*.

En el presente trabajo tampoco se podrá realizar los estudios de estabilidad del producto, por el costo y tiempo que este ensayo demanda.



## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la investigación

#### 2.1.1. Estudios a nivel internacional

Lopez *et al.* (2015)<sup>8</sup> evaluaron la eficacia de los aceites esenciales (EO) de eucalipto (*Eucalyptus globulus* L.), Thymus (*Thymus capitatus* L.), pirul (*Schinus molle* L.) para controlar el crecimiento de *Aspergillus parasiticus* y *Fusarium moniliforme* y su capacidad para producir micotoxinas. Para ello utilizaron los datos del crecimiento radial cinético para obtener la concentración Máxima inhibitoria (IC<sub>50</sub>). Utilizaron la IC<sub>50</sub> para evaluar la germinación cinética y micotoxinas de la germinación de esporas. Además, la viabilidad de esporas la evaluaron mediante el ensayo MTT. Todos los EO tuvieron un efecto en el crecimiento radial de ambas especies. Después de 96 h de incubación, el EO del thymus a concentraciones de 1000 y 2500  $\mu\text{L L}^{-1}$  inhibió totalmente el crecimiento de *F. moniliforme* y *A. parasiticus*, respectivamente. EO de Eucalipto y thymus redujo significativamente la germinación de esporas de *A. parasiticus*. La inhibición de la germinación de esporas de *F. moniliforme* fue de 84,6, 34,0 y 30,6% cuando se expusieron a EO de eucalipto, pirul y thymus, respectivamente. El thymus y el eucalipto redujeron la producción de aflatoxina (4%) y fumonisina (31%), respectivamente. La viabilidad de la espora se vio afectada cuando la concentración de aceites aumentó, siendo el EO de timo el que redujo la proliferación de ambos hongos. Sus hallazgos sugieren que la EO afecta el desarrollo de *F. moniliforme* y *A. parasiticus* y la producción de micotoxinas”.

En el estudio de De Siqueira *et al.* (2015)<sup>2</sup> se evalúa la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. y de las sustancias xilitol y papaína frente a los siguientes microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa*; *Samonella* sp.; *Staphylococcus aureus*; *Proteus vulgaris*; *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Para la evaluación antimicrobiana *in vitro* utilizaron la prueba de difusión en agar y la evaluación del diámetro de la zona de inhibición de las sustancias ensayadas. Usaron clorhexidina al 0,5% como control. Demostraron que el aceite de *Eucalyptus globulus* mostró mayor inhibición que la clorhexidina cuando se aplicó a *Staphylococcus aureus*, e igual inhibición cuando se aplicó a los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y

*Candida albicans*. En su investigación la papaína al 10% mostró menor efecto antimicrobiano que la clorhexidina en relación con *Candida albicans*. Para ellos el xilitol no mostró inhibición de los microorganismos ensayados. Concluyen su investigación manifestando que el aceite de *Eucalyptus globulus* tiene actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos y parece ser una alternativa viable como agente germicida, por lo que se recomienda una investigación adicional.

Lorca *et al.* (2005)<sup>9</sup> nos mencionan que: “el alcohol ha formado parte de la formulación de enjuagues bucales desde hace más de 50 años. Como otros principios no está exento de efectos secundarios debidos en su mayor parte al efecto sobre las células epiteliales, por lo que está contraindicada su utilización en pacientes con mucosas lesionadas o sensibles. Recientemente se atribuyeron a los colutorios con alcohol un posible efecto sobre el desarrollo de lesiones de cáncer oral. La literatura sobre el tema nos muestra que la mayoría de los estudios existentes tienen muchas limitaciones y que no hay indicios de que exista ninguna asociación entre la utilización de colutorios con alcohol y el desarrollo de lesiones cancerígenas. La FDA, la ADA y el NCI aceptan el alcohol como un componente seguro en la formulación de enjuagues.”

De manera similar Carretero *et al.* (2004)<sup>1</sup> mencionan lo siguiente: “El alcohol se emplea en los colutorios, en principio, como un disolvente de otros ingredientes y como un conservante de la preparación. Se han usado diferentes formulaciones de colutorios durante años, sin embargo, recientemente se ha expresado la preocupación sobre si su contenido de alcohol podría ser una amenaza para la salud. La elevada cantidad de alcohol en algunos colutorios, así como el hecho de que permanecen en contacto con la mucosa oral durante más tiempo que una bebida alcohólica, puede hacer pensar en un efecto nocivo a partir de un mecanismo local. El enjuague oral aumenta el tiempo de exposición de la mucosa al alcohol y se ha demostrado que colutorios con alto contenido en alcohol producen lesiones hiperqueratósicas tanto en hombres como en animales de estudio.

Actualmente y con los datos que disponemos, no se ha podido establecer una relación causal entre el uso de colutorios con alcohol y el desarrollo de cáncer

oral. Tampoco existen evidencias de que el alcohol aumente el efecto de los agentes antiplaca en los colutorios.”

### **2.1.2. Estudios a nivel nacional**

En nuestro país, Mendez (2016)<sup>10</sup> evaluó el efecto sinérgico antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare* sobre *Escherichia coli*. Para este trabajo empleó el método de destilación por arrastre de vapor para obtener los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare*. Una cepa silvestre de *Escherichia coli* fue expuesta a estos aceites esenciales al 5%, 25%, 50%, 75%, 100% para obtener la concentración mínima bactericida (CMB) de los mismos. Posteriormente evaluó la interacción sinérgica de ambos aceites a concentraciones mínimas bactericidas mediante el método de difusión de discos modificado, utilizando a Ciprofloxacino como control positivo y a Tween 80 como control negativo; realizó cinco repeticiones para cada caso. Como resultado obtuvo que la CMB es de 75% tanto para el aceite de *Eucalyptus globulus* como de *Origanum vulgare* (equivalente a una concentración de 0.69 g/ml y 0.71 g/ml para cada uno de ellos respectivamente); sin embargo pudo demostrar que todas las concentraciones de los aceites esenciales ensayadas tuvieron un notable efecto antibacteriano. Según la escala de Duraffourd, la cepa de *E. coli* en estudio es muy sensible a la combinación de ambos aceites a concentraciones mínimas bactericidas. Concluyó su trabajo manifestando que existe un efecto sinérgico antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare* sobre *Escherichia coli*.

En el estudio de Saguma (2016)<sup>11</sup> se evaluó la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a concentraciones de 25, 50, 75 y 100% del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, el cual se obtuvo a partir de las hojas de este, por el método de destilación por arrastre con vapor de agua. La sensibilidad de estos microorganismos se determinó por el método de difusión en agar, utilizando Vancomicina y Ciprofloxacina como controles para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente, realizó ensayos por triplicado y con cuatro repeticiones. Aunque todas las concentraciones tuvieron efecto inhibitorio en ambas bacterias; determinó que *Staphylococcus aureus* presentó mayor sensibilidad, estadísticamente

significativa ( $p < 0.05$ ) a las concentraciones de 75 y 100% del aceite esencial en relación a la Vancomicina, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* frente a la concentración de 100% en relación a la Ciprofloxacina.

Salas (2016)<sup>12</sup> realizó la investigación en los meses de Noviembre del 2015 a Abril del 2016 teniendo como objetivo determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*. La recolección de la muña la realizó en la ciudad de Puno y la obtención del aceite esencial de la muña se efectuó en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la UNA – Puno, las muestras de esputo se obtuvieron de pacientes con tuberculosis del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón”, el aislamiento, identificación y la determinación del efecto antimicótico, se realizó en el laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno. El efecto antimicótico lo determinó midiendo 105 halos de inhibición, utilizando el método de Kirby – Bauer (antibiograma antimicótico), utilizó una cepa clínica de *Cándida albicans* aislados de pacientes con tuberculosis. Los grupos de estudio fueron concentraciones de 1ml/25 $\mu$ l (T1), 1ml/50 $\mu$ l (T2), 1ml/100 $\mu$ l (T3), 1ml/150 $\mu$ l (T4), 1ml/200 $\mu$ l (T5), 1ml/250 $\mu$ l (T6), donde (ml/ $\mu$ l es la proporción de agua destilada y aceite de muña respectivamente), un grupo control positivo (Fluconazol), y un grupo control negativo (agua destilada estéril) El análisis estadístico que empleó fue ANOVA para determinar el efecto antimicótico y Tukey para la concentración inhibitoria adecuada y la evaluación de los halos de inhibición. Sus resultados fueron los siguiente: La media de los halos de inhibición del T1 fue de 3,4mm (0,0 – 4,9); del T2 11,1mm (10,1 – 11,9); del T3 15,7mm (14,4 – 16,9); del T4 19,0mm (17,9 – 20,0); del T5 24,1mm (23,4 – 25,2); del T6 29,2mm (28,3 – 30,0); y del grupo de Fluconazol 25,5mm (24,8 – 26,8). No se obtuvo halos de inhibición en el grupo de control negativo. Encontró diferencia significativa entre el T1 – T6 y el grupo de Fluconazol ( $p < .0001$ ), a un  $\alpha = 0.05$ . Concluye que de los seis tratamientos, el sexto demostró una concentración inhibitoria adecuada de 1ml/250 $\mu$ l (T6), resultando ser superior con un diámetro de halo de inhibición mayor, en comparación al Fluconazol (control positivo), demostrándose que el aceite

esencial de *Minthostachys mollis* tiene efecto antimicótico sobre cepas de *Cándida albicans*.

En su investigación, Acho *et al.* (2014)<sup>13</sup> demostraron la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos acuosos liofilizados de hojas de *Eucalyptus globulus* Labill (Eucalipto) y corteza de *Cinnamomun zeilanicum* Blume (Canela) frente a *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antibacteriana la determinaron en principio por el método de difusión (Kirby Bauer) para conocer el grado de sensibilidad según el tamaño del halo de inhibición y también por el método de Macrodilución en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria; a partir de esta última se determinó la Concentración Mínima Bactericida en medio sólido. Analizaron los resultados de los ensayos, y se observaron que el extracto acuoso de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill a concentraciones de 600, 700 y 800 mg/ml, tuvo 50 %, 51.7 %, y 57.2 %, respectivamente de actividad frente a *Enterococcus faecalis*; con *Escherichia coli* a las mismas concentraciones se obtuvieron 54.7 %, 57.1 % y 57.1 % de actividad, respectivamente; mientras que con *Staphylococcus aureus* se obtuvo un 49.2 %, 49.2 % y 50.8 %, respectivamente. Con las cortezas de *Cinnamomun zeilanicum* Blume a concentraciones 600, 700 y 800 mg/ml se obtuvieron, respectivamente, 32 %, 38.8 %, 31.3 % de actividad frente a *Enterococcus faecalis*; con *Escherichia coli* a 600 mg/ml se obtuvo 13.3 %, mientras que a 700 y 800 mg/ml tuvo 20 % de actividad. Con *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 600, 700 y 800 mg/ml se obtuvo un 28.6 %, 51.4 %, 46.4 % de actividad, respectivamente. En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, el extracto de hojas de *Eucalyptus globulus* Labill presentó una C.M.I. de 16 mg/ml; la corteza de *Cinnamomun zeilanicum* Blume presentó 32 mg/ml. Así mismo, se encontraron que la Concentración Mínima Bactericida del extracto de hojas de *Eucalyptus globulus* Labill fue significativa, mientras que en cortezas de *Cinnamomun zeilanicum* Blume no se encontraron una C.M.B.

Alvarado *et al.* (2014)<sup>14</sup> evaluaron el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis. El extracto se obtuvo de hojas secas de *Eucalyptus globulus* L. con etanol al 80 % (v/v). Las concentraciones que

emplearon fueron 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml usadas en 10 cepas de *Staphylococcus aureus*. Evaluaron el efecto inhibitorio por el método de difusión de KIRBY BAUER. Para ellos la cepa más sensible fue *Staphylococcus aureus* 2, mientras que *Staphylococcus aureus* 10 mostró mayor resistencia al extracto. Ambas variables en estudio mostraron diferencias significativas. Concluyen que el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" tiene efecto inhibitorio en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas lecheras con mastitis siendo directamente proporcional a la concentración del extracto variando ligeramente entre cepas; donde la concentración que tuvo mayor efecto inhibitorio fue 500mg/ml con halo promedio de 19.29 mm en la totalidad de las cepas.

Para Cruzado (2014)<sup>3</sup> quien determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) obtenidos mediante la técnica de arrastre de vapor de los talluelos, hojas y flores de la "Muña" que fue la sustancia en estudio, frente al *Streptococcus mutans*, con el fin de buscar nuevas alternativas para la prevención de la caries dental. Su estudio se realizó utilizando cuatro concentraciones del aceite esencial (25%, 50%, 75% y 100%); utilizó la amoxicilina de 30 µg como control positivo y agua destilada como control negativo; los cuales fueron puestos en contacto con el microorganismo de estudio; para así poder determinar la concentración inhibitoria mínima. Determinó que a la concentración de 50% presentó efecto inhibitorio y este efecto se incrementa en relación directa con el aumento de la concentración y este es estadísticamente similar al obtenido por el control positivo (amoxicilina).

Para Morales (2014)<sup>15</sup> quien evaluó la susceptibilidad bacteriana in vitro del *Enterococcus faecalis* frente a diferentes concentraciones de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto) en comparación con hipoclorito de sodio al 2.5%. El efecto antibacteriano lo determinó mediante la técnica por difusión en agar, con 5 grupos experimentales, 4 concentraciones de aceite esencial, y un grupo control donde se utilizó únicamente hipoclorito de sodio al 2.5%. La muestra estuvo constituida por 80 repeticiones realizadas (con aceite esencial de eucalipto a diferentes concentraciones o con hipoclorito de sodio al 2.5%) en cada placa petri con la cepa de *Enterococcus faecalis*. Encontró que la susceptibilidad bacteriana in vitro del *Enterococcus faecalis* frente al aceite esencial de

*Eucalyptus globulus* (eucalipto) al 100% y 75% fue mayor en comparación con hipoclorito de sodio al 2.5%.

Ccallo (2013)<sup>16</sup> trabajó con muestras tipificadas de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* y el aceite esencial de la muña. La investigación se realizó en tres etapas; la Primera de recolección de la especie mencionada en la localidad de Marangani, Provincia de Canchis, en el Departamento de Cusco; la segunda etapa de obtención del aceite esencial, por el método de destilación de arrastre a vapor de agua a partir de la hojas desecadas de *Minthostachys mollis* (muña), en el laboratorio de procesos y operaciones unitarias de la Facultad de Ingeniería Química y la tercera etapa, en la cual se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), para lo que se utilizó el método de macrodilución en caldo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña), en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana. Empleó análisis descriptivo para obtener los promedios y desviaciones estándar de las variables de las cepas bacterianas estudiadas, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa del efecto de inhibición del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) a diferentes concentraciones frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans*  $P < 0.01$  ANOVA y del efecto de inhibición del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) a diferentes concentraciones frente a la actividad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis*  $P < 0.01$  ANOVA. Se utilizó la prueba T-Student para determinar la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) del efecto inhibitorio de aceite esencial frente al *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Sus resultados fueron que la concentración mínima inhibitoria para *Streptococcus mutans* es 0.448g/ml de aceite esencial, ya que esta concentración inhibe el 50% del crecimiento bacteriano y para *Porphyromonas gingivalis* es mayor a 0.448g/ml de aceite esencial, ya que es la mayor concentración en la que se trabajó y solo se inhibió el 23.05 % de crecimiento bacteriano. Concluye que el aceite esencial de muña inhibe a *Streptococcus mutans* y a *Porphyromonas gingivalis*.

## **2.2. Teorías generales**

### **2.2.1. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales son productos volátiles de naturaleza compleja elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable. Oficialmente se denominan aceites esenciales los productos que se pueden obtener por arrastre con corriente de vapor de agua o por expresión del pericarpio de ciertos frutos. Habitualmente, también se denominan esencias, si bien esta denominación es más amplia, ya que engloba aceites esenciales y a otras sustancias obtenidas por métodos extractivos bastante diversos.<sup>17</sup>

#### **2.2.1.1 Características**

Los aceites esenciales son generalmente líquidos a temperatura ambiente, aunque algunos solidifican a baja temperatura como, por ejemplo la esencia de anís. La mayoría son prácticamente transparentes, incoloros o ligeramente coloreados (amarillentos) con excepciones como la esencia de manzanilla, que contiene camazuleno de un intenso color azul. Algunos aceites esenciales son inflamables. Generalmente, son menos densos que el agua, aunque también hay excepciones como las esencias de clavo y de canela, que son más densas. Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque algunos de sus componentes se solubilizan, como por ejemplo los fenoles). Los aceites esenciales son lipófilos y solubles en disolventes orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc). La solubilidad en alcohol es variable y suelen ser solubles en el alcohol de alta graduación. Poseen de índice de refracción elevado y presentan actividad óptica (desvía el plano de la luz polarizada, tiene poder rotatorio). Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos.<sup>17</sup>

#### **2.2.1.2 Distribución**

Los aceites esenciales se encuentran en vegetales superiores, concretamente en ciertas familias de angiospermas, de las cuales cabe destacar:

- Coníferas: *Pinus sp.*



- Apiáceas o umbelíferas: Anís, hinojo
- Labiadas o lamiáceas: menta, melissa, lavanda
- Lauráceas: canela
- Asteráceas o compuestas: manzanillas
- Mirtáceas: eucalipto, clavo
- Rutáceas: cítricos<sup>17</sup>

### **2.2.1.3 Localización**

Los aceites esenciales se encuentran localizados en diferentes órganos vegetales:

- Raíz, rizoma: cúrcuma, jengibre
- Fruto: molle
- Corteza: canela
- Leño: alcanfor
- Sumidades floridas: menta, lavanda, romero
- Flores: manzanillas
- Hojas: eucalipto, laurel, boldo

Los aceites esenciales se acumulan en cavidades secretoras, células, en pelos secretores, en canales secretores, etc.<sup>17</sup>

### **2.2.1.4 Función en el vegetal**

En los vegetales los aceites esenciales pueden desempeñar diferentes papeles, los cuales, aparentemente, están siempre relacionados con sus propiedades volátiles y olorosas:

- Intervienen en la polinización, ejerciendo un efecto de atracción sobre ciertos insectos polinizadores.
- Actúan como defensas frente al ataque de parásitos.<sup>17</sup>

## **2.2.1.5. Métodos de obtención**

### **2.2.1.5.1. Arrastre con vapor de agua**

Para realizar la destilación por arrastre con vapor se usan alambiques de características variables y adaptadas a cada tipo o caso específico.<sup>18</sup>

### **2.2.1.5.2. La hidrodestilación simple o destilación con agua.**

Consiste en sumergir directamente el material vegetal a tratar en agua, que a continuación se somete a ebullición. En éste método es máxima la acción del agua sobre el material, por ello se puede presentar hidrólisis y oxidaciones. Útil para materiales que tienden al apelmazamiento (flores pequeñas). Es aconsejable cargar el agua ya caliente para disminuir la hidrólisis y el tiempo de operación. Los vapores heterogéneos se condensan y el aceite esencial se separa por diferencia de densidad. Ej.: Trementina<sup>18</sup>

### **2.2.1.5.3. Destilación con vapor saturado o destilación con agua y vapor.**

El vegetal no está en contacto con el agua; el vapor de agua se inyecta a través de la masa vegetal dispuesta sobre placas perforadas. El material debe tener tamaño uniforme para favorecer el paso del vapor. Trabaja cerca de los 100°C cuando lo hace a 1 atm de presión y el rendimiento es bueno siempre y cuando no se presenten apelmazamientos. Por cargarse el material a una temperatura menor a la de trabajo, se producen condensaciones sobre él y ésta humedad origina cierta dificultad en la operación, especialmente en el paso y distribución del vapor por la muestra. Por su sencillez, bajo costo y rendimientos, esta técnica es la más usada en la industria de aceites esenciales. Varias Farmacopeas la recomiendan como el método óptimo de obtención de esencias.<sup>18</sup>

#### **2.2.1.5.4. La destilación con vapor seco o sobrecalentado.**

Consiste en impulsar el vapor a través de la masa vegetal, colocada sobre columnas o cestones. El vapor tiende a recalentarse por la resistencia opuesta a su paso por el material y esto debe evitarse en lo posible, debido a que seca las membranas celulares e impide la salida del aceite. Las instalaciones son más costosas, pero presentan mayores producciones.<sup>18</sup>

#### **2.2.1.5.5. Fundamentos de la destilación por arrastre con vapor de agua.**

La destilación por arrastre con vapor es utilizada para separar sustancias ligeramente volátiles e insolubles en agua, de otros productos no volátiles mezclados con ellas.

Para la comprensión de ésta operación, se hace la consideración del comportamiento en la destilación de un sistema de 2 fases formado por dos líquidos, x e y, completamente insolubles entre sí (agua y aceite esencial); cada líquido ejerce su propia tensión de vapor, independiente de la otra. Así, la Presión total (PT), se puede calcular de la siguiente forma:

$$PT = P_X + P_Y \text{ (a T)}$$

Donde:

$P_X$  = Presión de vapor de X a T

$P_Y$  = Presión de vapor de Y a T

El punto de ebullición de la mezcla será aquella temperatura en la que la presión total PT, sea igual a la atmosférica.

Puesto que la presión ejercida por un gas (a una temperatura dada) es proporcional a la concentración de sus moléculas, la relación de las presiones de vapor de X e Y en el punto de ebullición de la mezcla será igual a la relación entre el número de moléculas de X y de Y que destilan

de la mezcla. Así la composición del vapor se puede calcular de la siguiente forma:

$$\frac{N_X}{N_Y} = \frac{P_X}{P_Y} \text{ Ec. 1}$$

Donde:

$N_X/N_Y$ : Relación molar de X e Y en el vapor

O bien:

$$\frac{W_X}{W_Y} = \frac{P_X * M_X}{P_Y * M_Y} \text{ Ec. 2}$$

Donde:

$W_X/W_Y$ : Relación de pesos de X e Y en el vapor

$M_X$ : Peso molecular de X

$M_Y$ : Peso molecular de Y

De la ec. 2, se puede decir que en la destilación de una mezcla de dos líquidos no miscibles las cantidades relativas en peso de los dos líquidos que se recogen son directamente proporcional a las presiones de vapor de los líquidos a la temperatura de destilación y a sus pesos moleculares. Además, la mezcla destilará a una temperatura constante en tanto exista por lo menos algo de cada uno de los componentes.<sup>18</sup>

#### **2.2.1.5.6. Expresión**

Aplicado generalmente a la familia Citrus. El principio del método es muy simple: las cáscaras se dilaceran y el contenido de las glándulas secretoras que se han roto se recupera por un procedimiento físico.

El procedimiento clásico consiste en ejercer bajo una corriente de agua, una acción abrasiva sobre la superficie del fruto. Después de eliminar los desechos sólidos, el aceite esencial se separa de la fase acuosa por centrifugación.<sup>18</sup>

#### **2.2.1.6. Factores de variabilidad de los aceites esenciales**

No es raro encontrar, en el mercado de aceites esenciales, productos para los cuales el órgano productor (hoja, corteza), el origen geográfico –incluso el origen botánico- no se especifica con todo el rigor deseable. La misma imprecisión se puede encontrar, en alguna ocasión, en la documentación contenida en los artículos publicados en revistas llamadas “científicas”. A modo de disculpa, es preciso reconocer que ciertas abreviaturas son fuente de ambigüedad y que las denominaciones tradicionales no siempre son unívocas.

Ejemplo: frecuentemente se habla de orégano y de aceite de orégano. ¿Se trata del orégano de Grecia (*Origanum Vulgare* L. ssp. *Viride* [Boiss.] Hayak), del orégano de España (*Corydothymus capitatus* [L.] Hoff. Y Link.), el orégano de México (*Lippia graveolens* HBK) o del orégano de Turquía (*Origanum onites* L.)?<sup>19</sup>

#### **2.2.1.7. Existencia de Quimiotipos**

Los quimiotipos –llamados también razas químicas- son muy frecuentes en plantas con aceites esenciales. Uno de los ejemplos más demostrativos es el del tomillo (*Thymus vulgaris* L.) del Mediterráneo occidental. Se cuentan para esta especie, morfológicamente homogénea y cariológicamente estable, siete quimiotipos diferentes: seis en los carrascales del sur de Francia (con timol, carvacrol, geraniol, linalil,  $\alpha$ -terpineol, *trans*-4-tuanol y *cis*-8-mircenol) y uno, en España, con cineol. El mismo fenómeno se observa en otras especies del género *Thymus* y también en otras Lamiaceae: quimiotipos timol y carvacrol se han detectado en ciertas especies de *Thymbra*, *Satureja*, *Mejorana*, *Origanum* y *Corydothymus*.<sup>19</sup>

#### **2.2.1.8. Influencia del ciclo Vegetativo**

Para una especie determinada la proporción de los diferentes constituyentes de un aceite esencial puede variar a lo largo de su desarrollo. Así, en *Menta piperita*, la disminución del contenido en (-)-mentona, observada a lo largo del ciclo vegetativo, corresponde a una reducción en (-)-mentol y (+)-neomentol: el contenido en (-)-mentol (libre y esterificado) aumenta, el de (+)-neomentol no aumenta –al contrario- debido a su conversión en un derivado hidrosoluble, el

glucósido de (+)-neomentilo. Habitualmente se observan en otras especies variaciones, a veces muy importantes: hinojo, zanahoria, cilantro (en esta última el contenido en linalol es un 50% más elevado en el fruto maduro que en el fruto verde), etc.<sup>19</sup>

#### **2.2.1.9. Influencia de los factores extrínsecos**

Influyen los factores del entorno y las prácticas de cultivo. La temperatura, la humedad relativa, la duración total de la insolación y el régimen de los vientos ejercen una influencia directa, sobre todo en especies que poseen estructuras histológicas de almacenamiento superficiales (ej.: pelos secretores de las Lamiaceae). Cuando la localización es más profunda la calidad es mucho más constante.

En ciertos *Citrus*, el contenido es tanto más importante cuanto más elevada es la temperatura.

Las prácticas de cultivo son también determinantes en el rendimiento y la calidad del producto final. El aporte de abonos y la influencia de las variaciones N, P, K se ha estudiado en diversas especies. La experiencia demuestra que no hay reglas generales aplicables en todos los casos. Otro elemento fundamental es el régimen hídrico. Una vez más, cualquier generalización puede ser aventurada.<sup>19</sup>

#### **2.2.1.10. Influencia del proceso de obtención**

La labilidad de los constituyentes de los aceites esenciales explica que la composición del producto obtenido por hidrodestilación, sea generalmente diferente de la mezcla de constituyentes inicialmente presente en los órganos secretores del vegetal. Durante la hidrodestilación, el agua, la acidez y la temperatura pueden inducir la hidrólisis de los ésteres pero también reagrupamientos, isomerizaciones, racemizaciones, oxidaciones, etc. El comportamiento del *cis*-hidrato de sabineno demuestra esta inestabilidad. Este compuesto y su derivado acetilado son los constituyentes ampliamente mayoritarios de la esencia obtenida por extracción con pentano después de triturar, en nitrógeno líquido, las sumidades floridas de la mejorana (*Origanum majorana* L.). La hidrodestilación de estas ramas origina un producto que contiene

entre otros elementos, gran proporción de terpin-1-en-4-ol, acompañado de  $\gamma$ - y de  $\alpha$ -terpinenos; paralelamente, el contenido en acetato de *cis*-hidrato de sabineno es despreciable. Los experimentos realizados con el *cis*-hidrato de sabineno y su acetato (sintéticos) demuestra que un simple reflujo con agua los descompone: en 30 minutos, no queda más que un 10% del acetato y 85% del alcohol mientras que aparecen el terpin-1-en-4-ol (mayoritario),  $\gamma$ - y  $\alpha$ -terpinenos, *p*-cimeno, limoneno, terpinoleno y  $\alpha$ -terpineol. Se comprenden mejor las importantes variaciones de composición que se desprenden del análisis bibliográfico realizado sobre este aceite esencial (prácticamente de 0 a 40% para el hidrato de sabineno y/o el terpin-1-en-4-ol).

Es necesario señalar también, entre los factores que influyen sobre la composición, la influencia del estado de la materia prima: en algunas Lamiaceae, es suficiente el almacenamiento durante 24 horas para inducir cambios sensibles en su composición (los cuales pueden, por otra parte, ser deseables). Hay que señalar finalmente que la cinética de destilación no es idéntica para todos los constituyentes de un aceite esencial (Hidrocarburos, alcoholes, cetonas, etc.): La composición del destilado varía en función del tiempo. De ellos deriva la importancia que tiene, para asegurar la calidad del producto y su constancia, el estudiar, definir y controlar el conjunto de parámetros y del cultivo en la elaboración del producto final.<sup>19</sup>

## **2.2.2. Eucalyptus globulus Labill (Eucalipto)**

### **2.2.2.1. Clasificación sistemática**

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Myrtales
Familia	: Myrtaceae

Subfamilia	: Myrtoideae
Tribu	: Eucalypteae
Género	: Eucalyptus
Especie	: <i>Eucalyptus globulus Labill</i>
Nombre vulgar	: Eucalipto

#### **2.2.2.2. Descripción botánica**

Árbol de 70 a 90 m de altura, hojas con capa cerosa blanca. Se caracteriza por un importante polimorfismo, de jóvenes son opuestas, oblongas de 7 a 15 cm de largo; cuando son adultas son alternas. Inflorescencia axilar, solitaria, botones sésiles, flores de 4 cm de ancho, masa proveniente de estambres, fruto cónico de 2 a 3 cm de ancho y numerosas semillas. Tronco largo generalmente liso.<sup>6</sup>

#### **2.2.2.3. Hábitat y Distribución**

Es una especie originaria de Australia y Tasmania, cuenta con más de 500 especies, encontrándose distribuida en toda la cuenca Mediterránea, Francia, España, Italia, Portugal, Marruecos, Sudáfrica y en grandes zonas de Asia. En América se cultiva en climas tropicales, subtropicales y templados, desde California hasta Argentina.<sup>6</sup>

#### **2.2.2.4. Usos tradicionales**

La infusión de las hojas adultas de esta planta se emplea en afecciones respiratorias de diversa índole: bronquitis, asma, faringitis, amigdalitis, gripes y resfriados; también para el control de la diabetes, cistitis y vaginitis (en forma oral o duchas locales), y dermatitis de cualquier origen. En los casos de males respiratorios es común utilizar esta planta en forma de vaporizaciones.<sup>6</sup>

#### **2.2.2.5. Toxicidad**

En grandes dosis, el aceite de eucalipto, como otros aceites esenciales ha causado víctimas mortales. La muerte es provocada por la ingestión de 4 a 24 mL de aceites esenciales. Se presentan síntomas gastrointestinales que incluyen



ardor e irritación, náuseas, vómitos, diarrea; además, falta de oxígeno, debilidad, mareos, estupor, dificultad para respirar, delirio, parálisis, convulsiones y muerte, generalmente debido a una insuficiencia respiratoria. Las personas sensibles pueden desarrollar urticaria por el manejo del follaje y otras partes de la planta. Otras complicaciones que se pueden presentar son: inhibición de la movilidad ciliar y dermatitis por contacto. Es importante mencionar que el eucalipto es neurotóxico y epileptógeno.<sup>6</sup>

#### **2.2.2.6. Composición química del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill**

El contenido en aceite esencial está comprendido entre 5 y 35 ml/kg. El constituyente mayoritario (70 – 80%) es el 1.8-cineol (o eucaliptol); los demás constituyentes son principalmente terpénicos. La hoja contiene también una docena de heterociclos oxigenados con estructura acilfloroglucinol-mono- o sesquí terpénica – los euglobales y los macrocarpales- así como compuestos fenólicos, ácidos fenólicos comunes y flavonoides (rutósidos, hiperósido y, en la cera epicuticular, flavonas metiladas)<sup>19</sup>

#### **2.2.2.7. Acción farmacológica del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* Labill**

El aceite esencial de eucalipto está dotado de propiedades antisépticas demostradas *in vitro* inequívocamente sobre numerosos gérmenes. El cineol, fácilmente reabsorbido por vía digestiva tanto como por vía cutánea o rectal, se elimina por vía pulmonar y por vía renal. Numerosos autores reconocen en el aceite esencial de eucalipto (0.05-0.2 ml/día) propiedades expectorantes, estimulantes del epitelio bronquial y mucolíticas. El aceite esencial de eucalipto, como el mentol se considera “descongestionante” de las vías aéreas superiores en caso de rinitis; la acción de estos productos, sin duda, se reduce a la estimulación de los receptores habitualmente estimulados por el flujo de aire nasal (por ello la sensación de respirar mejor). A dosis altas, el aceite esencial de eucalipto es neurotóxico (DL<sub>50</sub> 1.7 ml/Kg, rata, i.p). El cineol es epileptógeno, siendo esta acción consecuencia de la inhibición del consumo de oxígeno y de los gradientes iónicos tisulares a nivel encefálico. Igualmente es inductor de las

enzimas microsomiales hepáticos (riesgo, mal conocido, de interacciones medicamentosas). En el hombre, la ingestión de 10 a 30 ml de aceite esencial es potencialmente mortal, pero los datos bibliográficos son contradictorios. A dosis más bajas se observan trastornos digestivos (vómitos) y una alteración a nivel de la consciencia, y a veces dificultades respiratorias. *In vitro*, el extracto hidroalcohólico de hojas se muestra antibacteriano, sobre todo respecto a las bacterias cariogénicas de la cavidad bucal; esta actividad es debida a los macrocarpales.<sup>19</sup>

### **2.2.3. *Minthostachys* sp. (muña)**

#### **2.2.3.1. Clasificación sistemática**

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Asteridae
Orden	: Lamiales
Familia	: Lamiaceae
Género	: <i>Minthostachys</i>
Especie	: <i>Minthostachys</i> sp.
Nombre vulgar	: “Muña”

#### **2.2.3.2. Descripción**

Se denomina en la lengua Quechua “muña”, y en la Aymara tiene 2 nombres: “Coa” y “Huaycha”. Debido a sus características semejantes al póléo y orégano, los españoles la denominaban poleo silvestre. Otros nombres vulgares con los que se le conoce a esta planta son: "Muña negra", "Polco silvestre", "coz", "muña-muña", "arash muña", "kon" "Orcco-muña".

La muña, es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3500 m.s.n.m. Habita entre los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, comportándose como tal; existe en gran abundancia. Así como es una planta hemicriptófila que durante la época más fría del invierno y seco desaparecen sus órganos aéreos para brotar nuevamente con las primeras lluvias de la primavera. Alcanza una altura de 0.80 a 1.50 m., desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, crece en lugares cercanos a acequias, manantiales sin tener grandes requerimientos de agua.

Se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, bien drenados, con buena retención de humedad, con un pH entre 5-8 y un clima con elevada luminosidad, florece en época de lluvia, se multiplica por semilla y por codo.<sup>20</sup>

### **2.2.3.3. Características botánicas**

Es una planta arbustiva, leñosa, frondosa en la parte superior, de aspecto general glauco, erecto y pubescente, su tallo es ramificado desde la base. La hoja es el elemento vegetativo simple ligeramente aserrado, carece de estípulas, cortamente pedunculares de filotaxia opuesta. Su peciolo mide entre 4 y 6 mm. de largo, pubescente acanalada en la parte superior y convexo en la parte inferior, es aquí donde se deposita la mayor cantidad de aceite, que al estrujarlos dejan sentir su aroma característico. Las flores son hermafroditas.

El limbo es ovoidal de 1.7 a 2.5 cm, en su mayor ancho, y de 2 a 4 cm. de largo; su base es atenuada de bordes aserrados, ápice agudo de nerviación penninervia. El limbo es pubescente tanto en el haz como en el envés, debido a lo cual la hoja presenta una coloración verde pálida; sus nervaduras secundarias son muy desarrolladas y ligeramente reticuladas.

El cáliz soldado con 13 venaciones terminado en 5 lóbulos dentados casi iguales entre sí con pelos cerulosos en la base, la corola raramente es de 6mm. De largo, dividida en 2 labios: 2 lóbulos o labio superior y 3 lóbulos o labio inferior. Los pelos de las partes aéreas, o sea de las hojas y tallos, parece que forman una especie de manto protector contra los cambios bruscos de temperatura y al mismo tiempo son los lugares en donde se deposita el aceite esencial, de aquí que al estrujarlos dejen sentir su aroma o el sabor picante que da una impresión

de frío que es característico. Las flores son pequeñas, reunidas en verticilos falsos, situados en la parte superior de las ramas con pedúnculos cortos, 2 en cada axila.<sup>20</sup>

#### **2.2.3.4. Metabolitos presentes en *Minthostachys sp.***

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

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

Carvacrol: Se ha encontrado para ser componentes dominantes en una menor proporción en los estudios del aceite de *Minthostachys mollis*. También se encuentra en varias hierbas conocidas como orégano (*Origanum vulgare*), ajedrea de verano (*Satureja hortensis*), tomillo (*Thymus serpyllum*), y es sobre todo un valor para sazonar.

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

Mentol: Por lo general, mucho menos importante en *Minthostachys mollis*, pero a veces se encuentra como componente minoritario de la mezcla del aceite. Produce sensación de frío y adormece el dolor.

Linalol: Empleado como condimento y como insecticida, linalol es el componente más conocido del cilantro (*Coriandrum sativum*), Apiaceae. A menudo es uno de los componentes menores del aceite esencial de *Minthostachys mollis*.

Timol: Como su nombre lo sugiere, esta sustancia es bien conocida de los aceites de distintas especies de tomillo. Actúa como antiséptico y contra el dolor de

garganta y tos. A veces se encuentra como un componente menor en el aceite esencial de *Minthostachys mollis*.<sup>20</sup>

#### **2.2.3.5. Tipos de *Minthostachys***

Se indica un total de 12 especies, cuya distribución abarca desde Argentina hasta Venezuela y en el Perú se encuentran 6 especies distribuidas desde el norte (Cajamarca) hasta el sur (Cusco), con una mayor distribución en la región central, cuyas especies son:

*Minthostachys glabrescens*

*Minthostachys salicifolia*

*Minthostachys setosa*

*Minthostachys spicata*

*Minthostachys tomentosa*

*Minthostachys mollis* (HBK) griseb<sup>21</sup>

#### **2.2.4. Colutorios**

##### **2.2.4.1. Definición**

Un colutorio antiplaca es un agente químico antimicrobiano, vehiculizado en forma líquida para poder ser utilizado en la cavidad oral. Los agentes químicos antimicrobianos deben ser capaces de destruir microorganismos, inhibir su reproducción o su metabolismo. Muchos son bactericidas y algunos bacteriostáticos.<sup>22</sup>

##### **2.2.4.2. Importancia**

La eliminación de la placa bacteriana es necesaria para mantener la salud gingival. Los métodos más efectivos para la eliminación de la misma son los mecánicos, mediante el cepillado dental y la higiene interproximal (seda dental, cepillos interproximales, etc.). Estos sistemas aplicados correctamente pueden llevar a la eliminación completa de la placa bacteriana. Sin embargo, adquirir unas correctas técnicas requiere un periodo largo de entrenamiento en cuanto a

destreza y motivación por parte del paciente. La experiencia clínica y los estudios de población muestran que estos métodos se utilizan de manera insuficiente por la gran mayoría de los pacientes. Además, existen personas con limitaciones físicas y/o mentales, pacientes ancianos, portadores de ortodoncia, etc., que no son capaces de realizar un correcto control de la placa bacteriana. La necesidad de una ayuda adicional en el control de la placa, propone el uso racional de los agentes antimicrobianos, como un complemento a los regímenes de higiene oral mecánicos. Debido a los diferentes efectos terapéuticos de los colutorios, será el profesional dental el responsable de valorar la conveniencia del uso individualizado de estos productos para cada paciente. No obstante, estos parámetros no deben ser lo único importante a la hora de recetar, pues otros como son el sabor, el coste... condicionará la utilización o no del producto por parte del paciente. Por ello es necesario, que el profesional conozca todas sus características.<sup>22</sup>

#### **2.2.4.3. Indicaciones y función de los colutorios**

Se han atribuido numerosas acciones a los colutorios. Entre ellas, la de controlar la caries dental, la sensibilidad de los dientes y la halitosis. Incluso encontramos colutorios para el tratamiento de la boca seca. Una de las principales indicaciones de los mismos es el control de la placa bacteriana.

La función de un agente antimicrobiano para uso oral según Fischman se debería dar en tres campos:

1. Campo preventivo: Prevención de las enfermedades periodontales como agente antiplaca y antiinflamatorio.
2. Campo terapéutico: Tratamiento de las enfermedades bacterianas y micóticas específicas
3. Campo clínico: Prevención de contagios al disminuir la carga de microorganismos durante los procedimientos clínicos que generan aerosoles.

Actualmente no existe ningún colutorio antiplaca que tenga una efectividad demostrada en estos tres campos. Un colutorio ideal debería presentar las siguientes características:

- 1) Elevada actividad antimicrobiana intrínseca.
- 2) Eficacia de amplio espectro contra bacterias y levaduras.
- 3) Estabilidad química.
- 4) Sustantividad.
- 5) Seguridad toxicológica.
- 6) Ausencia de reacciones adversas.
- 7) Compatibilidad con la formulación de los dentífricos.

Sin embargo y a pesar de la gran cantidad de productos propuestos a la FDA (Food and Drug Administration) ninguno de los colutorios antiplaca disponibles actualmente en el mercado cumple con todos estos requisitos.<sup>22</sup>

#### **2.2.4.4. Componentes activos de los colutorios**

- Cloruro de zinc. Produce interferencia en la producción y volatilización de los productos olorosos. El efecto del zinc es beneficioso a diferentes niveles: capacidad de formar compuestos no volátiles a partir de compuestos volátiles de sulfuro (CVS); actividad antimicrobiana, ya que produce precipitación no selectiva de proteínas; reduce la degradación de elementos celulares en la saliva la inhibición de la actividad de la tiolproteínasa; disminuye la permeabilidad de las membranas al paso CVS.
- Cloruro de cetilpiridinio y cloruro de bencetonio. Son compuestos derivados del amonio cuaternario con demostrada actividad antibacteriana in vitro. In vivo su actividad antibacteriana es más limitada debido a su rápido aclaramiento de la cavidad bucal.
- Compuestos fenólicos (timol, eugenol). Tienen no sólo actividad antibacteriana, sino también cierta actividad antiinflamatoria. Dentro de este grupo destaca un compuesto químico, el triclosán. Es un antibacteriano potente que actúa a bajas concentraciones como bacteriostático. Ejerce su acción sobre la membrana citoplasmática, evitando la llegada a ella de aminoácidos esenciales. A mayores concentraciones, es bactericida, actúa desorganizando y destruyendo la

membrana basal bacteriana. Aunque no posee la propiedad de sustantividad, su unión a otros compuestos como zinc facilita un aclaramiento más lento y, por lo tanto, una mayor eficacia in vivo.

Otro compuesto útil es la clorhexidina, a altas dosis se comporta como bactericida, alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática bacteriana. A bajas concentraciones es bacteriostática, interfiriendo el mecanismo de transporte fosfoenolpiruvato fosfotransferasa. Su actividad antimicrobiana es rápida y duradera.<sup>23</sup>

#### **2.2.4.5. Presencia de alcohol en los colutorios**

El etanol se utiliza como conservante y disolvente en un intervalo de concentración de 5 a 27% en varios enjuagues bucales comercialmente disponible, tiene actividad antimicrobiana frente a diversas bacterias, hongos y virus por causar la desnaturalización de proteínas y la disolución de los lípidos. También está demostrado que los enjuagues bucales que contienen alcohol reducen la dureza de las restauraciones de resina y alteran el color de estas. Existen declaraciones que puede haber una asociación en el riesgo del desarrollo de cáncer en la vía oral pero es de nueve veces en los fumadores, cinco veces en los que también beben alcohol, y cinco veces en los que ni fuman ni beben alcohol, mientras que otros desmienten esta teoría. Por lo que se concluye que debe limitarse su uso a corto plazo, bajo supervisión hasta que los estudios a largo plazo estén disponibles. Por el momento el uso a largo plazo de los enjuagues bucales que contengan alcohol se debe evitar.<sup>24</sup>

#### **2.2.4.6. Colutorios que contienen alcohol y su relación con el Cáncer oral**

El etanol puro, por sí mismo, no es una sustancia carcinogénica, sin embargo, se asocia a sustancias carcinógenas que actúan como desencadenantes de la acción tóxica del alcohol. Así, el alcohol ejercería un efecto cáustico aumentando la permeabilidad de la mucosa oral y permitiendo el paso de otros carcinógenos como el tabaco. Entre las lesiones ocasionadas por el alcohol se encuentran:

- Desprendimiento del epitelio.
- Ulceraciones en la mucosa.



- Gingivitis.
- Petequias.
- Lesiones blancas.

Se ha investigado la asociación entre el cáncer oral y el uso de enjuagues orales con alto contenido en alcohol basándose en la hipótesis de que la permanencia del alcohol en contacto con la mucosa oral durante un mayor tiempo que al ingerir una bebida alcohólica podría hacer pensar en un posible efecto nocivo a partir de un mecanismo local. Sin embargo, no se ha podido confirmar una relación causal entre el uso de colutorios y el desarrollo de cáncer oral, pero, por otro lado, no se justificaría el empleo de alcohol en los colutorios orales.<sup>25</sup>

## **2.2.5. Microbiología oral**

### **2.2.5.1. Ecosistemas orales**

El término ecosistema hace referencia a la comunidad de diferentes seres vivos que, establecidos en un lugar, interactúan entre ellos y, a su vez con los factores físicos y químicos que conforman su entorno no vivo. En este sentido la cavidad oral puede considerarse como un gran ecosistema. En ella existen microorganismos que se relacionan entre sí, están inmersos en un ambiente específico, con elementos abióticos que les circundan, con el que también están estrechamente relacionados.<sup>26</sup>

### **2.2.5.2. Mucosa**

Como la de cualquier otra zona está constituida por a) epitelio de revestimiento queratinocítico con los estratos basal, espinoso, granuloso y, a veces, en algunas regiones, otro córneo y b) tejido conjuntivo subyacente o lámina propia; entre ambos se distingue una delgada membrana o lámina basal. La población epitelial queratinocítica se renueva periódicamente por un proceso descamativo que dura 12 o 13 días. La mucina y la fibronectina que la recubren tienen una gran significación ecológica en la cavidad oral.<sup>26</sup>

### **2.2.5.3. Superficies dentales, película adquirida y placa.**

#### **2.2.5.3.1. Superficies dentales**

Los dientes a diferencia de los epitelios mucosos, no son descamables y esta característica facilita la colonización y acumulación bacteriana. Están constituidos por estructuras especializadas de tejido epitelial y conjuntivo, mineralizados con una parte de material inorgánico, especialmente hidroxiapatita, y otra orgánica con colágeno proteoglicanos y diversas proteínas.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.3.2. Película adquirida**

Es una capa amorfa acelular de algo menos de 1 mm de espesor, constituida por la adsorción selectiva sobre las superficies dentarias de componentes salivales, especialmente glucoproteínas y proteínas, y en menor grado, de productos secretados por los microorganismos. Habrá diferencias en la composición de las distintas películas según se establezcan sobre cemento, esmalte, sarro, e incluso sobre materiales artificiales.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.3.3. Placa dental**

Aunque su composición varía con el tiempo de evolución y localización, podría definirse de forma general como una biopelícula formada por microorganismos adheridos entre sí y a una superficie dentaria, embebidos, entremezclados y rodeado de un material extracelular abiótico de un triple origen: bacteriano, saliva y dieta.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.4. Saliva**

Se trata de un líquido algo viscoso segregado al interior de la boca por diversas glándulas denominadas mayores y menores. Las mayores son tres pares de glándulas: a) las parótidas, que vierten su secreción a través del conducto de Stenon en las superficies de los molares y premolares superiores y b) las submaxilares y sublinguales, que lo hacen por medio del conducto común de Wharton en la parte más anterior del suelo de la boca a nivel de las superficies linguales de los incisivos inferiores. Las glándulas salivales menores, en número de 500-700, se localizan en: a) paladar duro, blando y úvula (palatinas); b) región del istmo en el pliegue glosopalatino o pilar anterior, extendiéndose a veces hasta

el paladar blando; c) en el tejido conjuntivo subyacente a la mucosa oral de los labios superior e inferior; d) en la mucosa que recubre la mejilla; e) en las proximidades de la glándula sublingual mayor y f) en la punta, el cuerpo y la raíz de la lengua. Estas secreciones se esparcirán y contactarán con otras zonas cercanas; al mismo tiempo, el movimiento de la lengua, labios y músculos mímicos de la cara las extenderán a otras regiones más amplias y se mezclarán con el líquido gingival, restos alimentarios, microorganismos y células descamadas de la mucosa oral, bañando abundantemente todos los ecosistemas primarios orales a excepción del surco gingival.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.5. Naturaleza de la microbiota oral.**

La microbiota oral es extraordinariamente compleja. Se han llegado a aislar hasta 20 especies distintas en una misma cavidad bucal en el transcurso del tiempo; la mayor parte tendría la característica de ser transitoria, de forma que como residente sólo quedarían unas 20 aproximadamente.<sup>26</sup>

##### **2.2.5.5.1. Cocos grampositivos**

Con gran diferencias sobre los demás son los estreptococos del grupo viridans los más aislados, tanto cualitativa como cuantitativamente, de todos los ecosistemas orales, en menor proporción se hallaría *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *S. mucilaginosus*, *Abiotrophia spp.*, y los anaerobios estrictos *Peptostreptococcus spp.*<sup>26</sup>

##### **2.2.5.5.2. Cocos gramnegativos**

Se detectan diversas especies, aerobias y comensales no exigentes, del género *Neisseria* y otras pertenecientes al género *Veillonella como anaerobias estrictas.*<sup>26</sup>

##### **2.2.5.5.3. Bacilos grampositivos**

Numerosos bacilos grampositivos y elementos filamentosos pleomórficos se aíslan de la cavidad oral. Destacan un número amplio de especies de los géneros *Actinomyces* y *Lactobacillus* y en menor cantidad *Corynebacterium matruchotii*, *Rothia dentocariosa*, especies de *Propionibacterium* y las pertenecientes a los géneros anaerobios *Eubacterium* y *Bifidobacterium.*<sup>26</sup>

Otras bacterias no bien identificadas se incluyen habitualmente bajo el término vago e impreciso de “difterorides” o “difteromorfos”, por su forma similar a las corinebacterias.

#### **2.2.5.5.4. Bacilos gramnegativos**

Sobresalen por su importancia los anaerobios estrictos no esporulados como *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Leptotrichiabuccalis*, *Selenomonas spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Leptotrichia buccalis*, *Selenomonas spp.*, y *Centipeda periodontii*. Igualmente destacan como bacterias anaerobias facultativas: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus spp.*, y algunas especies del género *Campylobacter*.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.5.5. Otros microorganismos**

Entre ellos sobresalen los treponemas comensales, hongos como *Candida spp.*, *Mycoplasma spp.*, y los escasos protozoos aislados en la cavidad oral como las especies *Trichomonas tenax* y *Entamoeba gingivalis*.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.6. Determinantes ecológicos orales**

Los factores que regulan la composición, el desarrollo, la cantidad, la coexistencia y la distribución de la microbiota oral en los diversos ecosistemas primarios se conocen como determinantes ecológicos. Son de cinco tipos: a) fisicoquímicos; b) de adhesión, agregación y coagregación; c) nutricionales; d) protectores del hospedador y e) antagonistas bacterianos.<sup>26</sup>

##### **2.2.5.6.1. Factores Fisicoquímicos**

La mayoría de los géneros y especies microbianas relacionadas con el hombre crecen, se reproducen y viven en unas condiciones ambientales que suelen ser bastante similares. Dichas condiciones, si no son óptimas, no deberán exceder de los límites de la tolerancia que, al menos, permitan una cierta proliferación microbiana o simplemente sobrevivir. Para los ecosistemas primarios orales, estas condiciones abióticas están presentes en la humedad, el pH, la temperatura y el potencial de oxidorreducción.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.6.1.1. Humedad**

El agua es un factor importante para las bacterias; el contenido acuoso de éstas oscila entre el 70 y 80% o más y dependen de él para el intercambio de nutrientes, para las reacciones metabólicas y para la eliminación de productos inhibidores de desecho. El agua será un factor favorable para el desarrollo microbiano en la cavidad oral, ya que su disponibilidad, debido a la saliva que baña todos los ecosistemas primarios, excepto el surco gingival, es muy elevada.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.6.1.2. pH**

En la mayoría de la superficies de la boca está regulado por la saliva; el pH de ésta oscila entre 6.5 y 7.5, un valor óptimo para el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos relacionados con el ser humano. Sin embargo, este pH, especialmente en determinadas zonas, está sometido a continuas fluctuaciones. Así, el consumo de azúcar en la placa va seguido de un descenso brusco de pH, de hasta 5 o menos, debido a la producción de ácidos en el curso del metabolismo bacteriano. Por el contrario, las condiciones de ayuno y el metabolismo proteico tienden a elevarlo. Las bacterias son particularmente lábiles a los descensos de pH; por ello, en la cavidad oral deberán disponer de sistemas amortiguadores que los eviten. Los propios microorganismos desarrollan estrategias para tolerar los ácidos, mediante proteínas de estrés, activando ATPasa, abriendo la puerta del lactato o inhibiendo sistemas de transporte intracelular de hidratos de carbono como el denominado fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa mediante la activación de la piruvatocinasa; igualmente pueden, por sí mismas, elaborar sustancias alcalinas a partir del catabolismo proteico mediante ureasas, desaminasas y otras enzimas. Aun así, es la saliva quien ejerce la función amortiguadora más importante para neutralizar la producción de ácidos por los microorganismos. Los reguladores salivales contienen, entre otros, bicarbonatos, fosfatos y proteínas ricas en histidina que es un aminoácido con capacidad tampón. De ellos, los más importantes son los primeros.

Los bicarbonatos liberan ácido carbónico débil cuando se añade un ácido y como aquel se descompone rápidamente en agua y CO<sub>2</sub>, que sale de la solución el

resultado no es la acumulación del ácido débil sino la completa eliminación del mismo.<sup>26</sup>

### **2.2.5.6.1.3. Temperatura**

En la cavidad oral está próxima a los 37 °C, que es la óptima para los microorganismos mesófilos que colonizan las superficies corporales. Pero, al igual que ocurría con el pH, sufre importantes oscilaciones relacionadas con la propia temperatura de los alimentos. Así tras la ingestión de un helado los valores pueden ser de hasta -5 °C, especialmente en las coronas de los dientes y las superficies mucosas. El hecho de tomar inmediatamente después, por ejemplo, un café caliente, puede elevarla a 55 °C. Esto supone que los microorganismos orales deben soportar y adaptarse a cambios de temperatura de hasta 60 °C en cuestión de segundos. Aunque estos hechos no son los habituales, está claro el gran poder de la mayor parte de los microorganismos orales para resistir las condiciones más desfavorables de temperatura. Aquellos que no son capaces de hacerlo serán eliminados de los ecosistemas orales, probablemente de forma transitoria, en tanto en cuanto no se reponga la temperatura óptima.

En determinados casos no son necesarias variaciones tan bruscas para modificar la fisiología de las bacterias orales; así, pequeños ascensos de la temperatura pueden afectar a la expresión de determinados genes como los relacionados con la virulencia: formación de fimbrias, producción de proteasas, síntesis de superóxido dismutasa, etc. Por ello, la temperatura no sólo sería un elemento de selección cuantitativa sino también, hasta cierto punto, un factor que regula la patogenicidad bacteriana. Esto ocurre, por ejemplo, en el surco gingival, cuando se transforma en bolsa por una enfermedad periodontal, de tal forma que se pueden alcanzar hasta los 38 °C; esto no sólo selecciona algunas bacterias periodontopatógenas (p. ej. *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus* o *Bacteroides forsythus*), sino que además favorece la expresión de ciertos factores de periodontopatogenicidad.<sup>26</sup>

### **2.2.5.6.2. Factores Nutricionales**

La gran cantidad y diversidad de microorganismos orales necesita una amplia gama de requisitos nutricionales, lo que los convierte en un importante

determinante ecológico. La distribución de aquellos se verá condicionada por la disponibilidad de nutrientes en las distintas localizaciones, por la competencia microbiana, por su capacidad de utilizarlos con eficacia y porque deben adaptar sus necesidades a los cambios ambientales que se producen, respondiendo rápidamente a los mismos.

La microbiota oral obtiene sus nutrientes de tres fuentes distintas; de los tejidos o secreciones del hospedador, de otros microorganismos y de la dieta.<sup>26</sup>

### **2.2.5.6.3. Acción antimicrobiana**

En la saliva hay una serie de compuestos inhibidores de algunos microorganismos que ejercen su actividad *in vitro*, si bien su importancia real *in vivo* no se conoce con exactitud. Parece que su acción va dirigida de manera principal frente a microorganismos transeúntes y que sólo ejercen una influencia selectiva, relativamente débil, sobre la microbiota residente. A continuación se señalan algunos de estos inhibidores.

- Glucoproteínas. Algunas histatinas destruyen células fúngicas germinadas e inhiben la germinación de formas de levaduras. Las cistatinas se unen a ciertas proteasas tiólicas inhibiendo las producidas por determinadas bacterias especialmente las periodontopatógenas.
- Lisozima. Rompe los enlaces entre N-acetil-murámico y N-acetilglucosamina de la mureína, de forma especial de las bacterias grampositivas, ya que las gramnegativas tienen protección supletoria de la membrana externa. Su actividad va ligada a un pH alcalino, por lo que su significación ecológica oral es dudosa.
- Lactoferrina. Similar a la que existe en otros compartimentos del organismo, se trata de una proteína capaz de fijar hierro ambiental. Cuando no está saturada puede tener un efecto antibacteriano al captar hierro disminuyendo la disponibilidad para las bacterias.
- Lactoperoxidasa. Numerosas bacterias orales, en el curso del catabolismo glucídico y de los aminoácidos, producen peróxido de hidrógeno que, además de su acción oxidante frente a otros microorganismos, puede resultar tóxico para las células del hospedador. La saliva contiene un

sistema detoxificante de  $H_2O_2$  mediante una enzima termolábil, denominada lactoperoxidasa (LP), que actúa junto con el tiocianato salival (SCN). El producto (hipotiocianato) tiene un efecto antimicrobiano, ya que se une a grupos  $-SH$  de enzimas bacterianas de la vía glucolítica, entre ellas las hexocinasas bloqueando su acción; además, parece que inhibe la captación de aminoácidos por algunas especies de lactobacilos. Así pues, el resultado de la acción de la LP sería no solo la detoxificación de  $H_2O_2$  sino también una disminución de los niveles de ácidos, producidos especialmente por estreptococos y lactobacilos, ya que bloquea sus fuentes energéticas. Consecuentemente evita la desmineralización de los tejidos duros dentarios.<sup>26</sup>

#### **2.2.5.6.4. Acción inmunitaria**

En este sentido, su principal constituyente es la IgA secretora que recubre superficies epiteliales. Su principal acción es la de unirse por su porción Fab a los microorganismos evitando su adhesión. El resto de las inmunoglobulinas (IgG e IgM), que están en menores cantidades, proceden del surco gingival. Suele además haber indicios de algunos factores del complemento cuyo origen es también el surco gingival; su papel protector es dudoso, ya que es difícil que se active por las pequeñas cantidades de IgG e IgM, y la IgA es incapaz de fijarlo.

Se detectan también grandes cantidades de células, especialmente cuando la salud periodontal es precaria. Proviene de la sangre y migran a la cavidad a través del surco gingival. Predominan los neutrófilos (98-99%) y, en menores cantidades, los linfocitos.

De los primeros, que aparecen redondeados por la escasa presión osmótica salival y pareciéndose poco a los sanguíneos (se les denomina corpúsculos salivales), se discute si conservan indemne su capacidad fagocítica o son simplemente células caducas en proceso de eliminación.

Visto el importante papel de la saliva como elemento defensivo en la cavidad oral, se entiende que su alteración en el flujo o en su composición produce importantes alteraciones en el hospedador. Éstas se refieren especialmente a los procesos de mineralización y desmineralización, a un incremento de la colonización microbiana



y a la aparición de caries. Así sucede, entre otros, con la administración de antidepresivos, anticolinérgicos, analgésicos, sedantes, radioterapia, diversas causas que producen xerostomía (disminución o cese de la secreción salival), tabaquismo, síndrome de Sjögren (tumefacción recidivante de las glándulas salivales con diversas manifestaciones generales de tipo reumático) y otros procesos y causas.<sup>26</sup>

## **2.2.6. *Klebsiella pneumoniae***

### **2.2.6.1. Características**

Bacilos que se ordenan solos, en pares e incluso en cadenas cortas. Las cepas son capsuladas (muy mucoides) y no móviles. La glucosa es fermentada con producción de ácido y abundante gas aunque pueden presentarse cepas anaerogénicas. Las reacciones en el indol, MR, VP, y el citrato de Simmons, varían. Usualmente la lisina carboxilasa es positiva y la ornitina negativa. Es una especie oportunista que puede causar bacteremia, neumonía e infecciones urinarias. Así mismo infecciones nosocomiales, neonatales, en unidades de cuidados intensivos y geriátricos.<sup>27</sup>

### **2.2.6.2. Aislamiento e Identificación**

Para el aislamiento selectivo e identificación presuntiva de cepas productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) se han desarrollado medios cromogénicos tales como CHROMagar KPC (CHROMagar), chromID ESBL (bioMérieux), CHROMagar ESBL (CHROMagar), Brilliance ESBL agar (Oxoid). Los mencionados han mostrado buena sensibilidad y especificidad.

Métodos fenotípicos y genotípicos permiten la detección de BLEE, cefalosporinasas y carbapenemasas. Se han estandarizado estrategias metodológicas para detectar enzimas tipo KPC y demás carbapenemasas, de acuerdo al método empleado para la prueba de sensibilidad, ya sea manual, automatizado (Phoenix, Vitek 2C) o métodos con gradiente de antibióticos.

Entre los comportamientos atípicos de algunas cepas de *K. pneumoniae* que dificultan la identificación y pueden conducir a error, se han descrito fenotipos con

lisina descarboxilasa negativa, que no utilizan el citrato, no hidrolizan la urea o no producen acetoina.<sup>28</sup>

### **2.2.6.3. Patogenicidad Odontológica**

La prevalencia de las enterobacterias varía entre diferentes regiones del mundo. En Suecia se reportó la presencia de entéricos en 34,9% de las muestras siendo las especies más representativas *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella oxytoca*. Similares resultados fueron encontrados, en adultos estadounidenses con periodontitis avanzada. Allí, la presencia de enterobacterias especialmente *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca*, fue del 28%. En estudios multicéntricos realizados en Colombia, Chile y España se reportaron prevalencias del 36% y 17,6% en Colombia y Chile respectivamente, mientras que en España no se encontraron entéricos. Las especies más frecuentemente encontradas en el estudio realizado en Colombia fueron la *Klebsiella pneumoniae* y el *Enterobacter cloacae*. Estos hallazgos confirman que los microorganismos no residentes usualmente constituyen menos del 1% de la cantidad total viable en una muestra subgingival. En una población Rumana con periodontitis, se reportó la presencia de entéricos en el 61,1% de los pacientes. En una investigación realizada en Sudán se demostró la presencia de enterobacterias en el 92% de los pacientes por el contrario en un estudio en Noruega, en el cual ninguno de los pacientes fue positivo para estos microorganismos. En el Brasil se han observado prevalencias del 31,2% de entéricos en placa subgingival, encontradas principalmente en bolsas periodontales profundas. La frecuencia de enterobacterias en otros países son: República Dominicana 67% y China 57%. Es importante anotar que los estudios realizados en Colombia asocian la presencia de entéricos a condiciones demográficas y características culturales del país.<sup>29</sup>

### **2.2.7. Staphylococcus aureus**

#### **2.2.7.1. Características**

El género *Staphylococcus* se clasifica, junto con los géneros *Micrococcus*, *Stomatococcus* y *Planococcus* dentro de la familia *Micrococcaceae*, que incluye a los cocos Gram-positivos catalasa-positivos. Tras su aislamiento de muestras

clínicas, estos cocos se diferencian de los pertenecientes a los géneros no patógenos por la positividad de diversas pruebas: i) sensibilidad a 100  $\mu$  g de furazolidina, ii) resistencia a 0,04 U de bacitracina, iii) negatividad de la prueba de oxidasa, iv) producción de ácido en anaerobiosis a partir de glucosa, v) producción de ácido a partir de glicerol en presencia de 0,4 mg/l de eritromicina, vi) sensibilidad a 200 mg/l de la endopeptidasa lisostafina, y vii) resistencia a la acción lítica de 100  $\mu$  g/ml de lisozima).

El género *Staphylococcus* incluye actualmente 32 especies y 8 subespecies aerobias y anaerobias facultativas, con la excepción de *S. saccharolyticus* y *S. aureus* subespecie *anaerobius*, que son anaerobias estrictas. De éstas, sólo aproximadamente 12 se encuentran normalmente colonizando al huésped humano, siendo *S. aureus* sin duda, la principal dentro del mencionado género. Aparecen como bacterias cocáceas grampositivas agrupadas en parejas, tétradas, cadenas cortas o, de forma característica, como racimos irregulares. Son inmóviles y no esporuladas. Crecen bien en los medios de cultivo habituales, muestran  $\beta$ -hemólisis en medios con sangre, y son capaces de desarrollarse a altas concentraciones de NaCl (medio selectivo de Chapman).

Las principales características identificativas de *S. aureus* que sirven para su diferenciación de otras especies del género son: i) producción de coagulasa; ii) sensibilidad al disco de 5  $\mu$  g de novobiocina; iii) actividad fosfatasa alcalina; iv) producción aeróbica de ácido a partir de D-trealosa y D-manitol, y v) producción de desoxirribonucleasa termoestable. Las cepas de *S. aureus* dan positivas, además, las siguientes reacciones:  $\beta$ -glucosidasa, arginina descarboxilasa, N-acetilglucosamina, acetoína, reducción de nitratos, ureasa y resistencia a la polimixina B (disco 300 U)<sup>30</sup>

#### **2.2.7.2. Aislamiento e identificación**

Para la identificación de *S. aureus* es necesario utilizar algunas pruebas bioquímicas y medios de cultivo especiales que permitan su fácil determinación. Esta identificación se basa en las enzimas y las toxinas que produce el microorganismo. Aprovechando estas características se han diseñado medios

para aislar esta bacteria, que son Baird-Parker, agar manitol salado, agar estafilococos N° 110, agar DNAsa.

Los primeros datos genéticos sobre la secuencia completa del genoma de *Staphylococcus aureus* datan de 2001 y proceden de las cepas Mu50 y N315. Actualmente, existen otras diez secuencias genómicas completas provenientes de otras cepas de *Staphylococcus aureus*.

Cabe destacar que el cromosoma bacteriano de este patógeno es circular y comprende 2.8-2.9 Mbp de tamaño, con un contenido de G+C de aproximadamente 33%. Razón por la cual se le agrupa de la siguiente manera: sección XXIV, clase 'Bacilli', orden II 'Lactobacillaceae', familia VIII, especie 47.<sup>31</sup>

### **2.2.7.3. Patogenicidad odontológica**

La endocarditis infecciosa usualmente está asociada con una alteración del endocardio, la cual promueve los depósitos de fibrina donde las bacterias se establecen y de ahí se descargan a la sangre. El diagnóstico se hace empleando imágenes de ecocardiografía, realizando hemocultivos e investigando los síntomas clínicos.

Se presenta un caso que corresponde a una niña de un año y nueve meses de edad, que desarrolló una endocarditis asociada con una infección por *Staphylococcus aureus*. La causa de muerte se debió a un choque séptico con múltiples embolias sépticas en diversos órganos. La posible puerta de entrada la constituyó una sepsis oral con gingivitis sangrante y caries.

Este caso indica que una higiene oral pobre representa un riesgo de invasión bacteriana con infección en tejidos cardiacos previamente normales.<sup>32</sup>

### **2.2.8. *Candida albicans***

#### **2.2.8.1. Características**

Son levaduras oportunistas que causan infecciones que van desde enfermedad de mucosas superficiales y cutáneas hasta enfermedad de diseminación hematológica, a menudo mortal.

La morfología oscila desde levaduras en gemación a pseudohifas e hifas verdaderas. La reproducción se basa en la formación de blastoconidios.<sup>33</sup>

#### **2.2.8.2. Aislamiento e identificación**

Aspecto clínico, examen microscópico directo y cultivo. Las infecciones se diseminan por vía hematógena y candidemia es difícil de diagnosticar basándose exclusivamente en datos clínicos.

El diagnóstico de laboratorio implica la obtención de material clínico adecuado, seguido de un examen microscópico directo, cultivo y la aplicación de análisis molecular, antigénico y proteómico.<sup>33</sup>

#### **2.2.8.3. Patogenicidad odontológica**

Las candidiasis o candidosis son las infecciones micóticas orales más frecuentes y fue la afectación oral por *Candida* la primera forma clínica descrita históricamente. Actualmente su incidencia está en aumento en los países desarrollados debido a diferentes factores facilitadores como la generalización del uso de prótesis dentales, la xerostomía, las múltiples terapias con antibióticos, inmunosupresores, antineoplásicos, etc., e incluso la mayor supervivencia de los pacientes con inmunodeficiencias. De estar clásicamente asociada a la infancia y a la ancianidad, esta enfermedad ha pasado a ser una manifestación común en otros grupos de pacientes como los infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o los sometidos a terapias inmunomoduladoras o antineoplásicas. La candidiasis oral, fue descrita como enfermedad asociada en el primer caso de sida publicado, y constituye la infección fúngica más frecuente en los pacientes VIH (+). Se considera que hasta un 90% de los individuos infectados por VIH sufrirán al menos un episodio de candidiasis orofaríngea.

La candidiasis oral como tal no es una enfermedad mortal, aunque provoca molestias de diferente grado y altera el gusto, haciendo desagradable y dolorosa la ingesta, lo que lleva a una disminución del apetito y a la emaciación del paciente, que puede resultar fatal en enfermos que precisen una ingesta hipercalórica como es el caso de los VIH (+) o pacientes hospitalizados o

ancianos. Junto a ello, puede ser la puerta de entrada de otras formas de candidiasis más graves, como la esofágica o la sistémica.

El tratamiento de las candidiasis orales resulta sencillo en los pacientes inmunocompetentes o con inmunosupresión leve, en los que generalmente los antifúngicos tópicos resultan eficaces, unidos siempre a la solución del proceso favorecedor. No obstante, en los estados de inmunosupresión más importante se plantea el problema de la alta tasa de recurrencias o recidivas, requiriendo la combinación de una terapia intensiva tanto sistémica como local. En algunos casos se ha llegado incluso a plantear la posibilidad de instaurar un tratamiento profiláctico con azoles, como en los pacientes VIH (+). A pesar de los excelentes resultados con los antifúngicos azólicos orales, asistimos a la aparición de formas clínicas de candidiasis oral crónica rebelde al tratamiento.<sup>34</sup>

### III. DISEÑO METODOLOGICO

#### 3.1. Tipo de estudio

- **Cuasi Experimental:** porque existe una exposición, una respuesta y una hipótesis para contrastar, pero no hay aleatorización de la muestra a los grupos de tratamiento.
- **Prospectivo:** debido a que la recolección de los datos se realizó conforme la ocurrencia de los hechos.
- **Transversal:** debido a que las variables serán observadas en un solo momento de acuerdo a los objetivos de la investigación.

#### 3.2. Muestra

El número de elementos incluidos en un estudio influye directamente sobre la potencia. Por ello, al planificar un estudio estadístico es indispensable determinar el número de elementos para tener una potencia suficiente (habitualmente se acepta que debe ser como mínimo del 80%)

$$n = \left(z_{\frac{\alpha}{2}} + z_{\beta}\right)^2 * \frac{s^2}{d^2} + 0.5 * z_{\frac{\alpha}{2}}^2$$

$n$  = tamaño de la muestra

$z_{\frac{\alpha}{2}}$  = valor de z correspondiente al riesgo  $\alpha$  fijado (bilateral)

$z_{\beta}$  = valor de z correspondiente al riesgo  $\beta$  fijado (unilateral)

$d$  = valor mínimo de la diferencia o efecto que se desea detectar

Calculando el número de réplicas necesario para realizar en la investigación de una muestra representativa del mismo ( $n=20$ , según estudios previos)

Datos:

Contenido del principio activo del colutorio: 125ml

Desviación estándar del método analítico 2ml

Límite de aceptación: 95-105% ( $125 \pm 6.25$ ml)

Riesgos  $\alpha=0.05$  y  $\beta=0.1$  (potencia 0.9)

$$n = \left(z_{\frac{\alpha}{2}} + z_{\beta}\right)^2 * \frac{s^2}{d^2} + 0.5 * z_{\frac{\alpha}{2}}^2 = (1.96 + 1.28)^2 * \frac{2^2}{(125 * 0.05)^2} + 0.5 * 196^2 = 2.99 \approx 3$$

### **3.3. Procedimiento**

#### **3.3.1. Obtención del aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña)**

##### **3.3.1.1. Recolección de las especies vegetales**

La obtención del aceite se realizó a partir de plantas frescas, o con un máximo de dos días de almacenamiento. Se recolectó hojas de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) en las alturas del Anexo de Marachanca, distrito de Matucana, provincia de Huarochirí, Departamento de Lima, las cuales serán conservadas a temperatura de ambiente sin desecar, exponer al sol o lavarlos hasta el momento de la extracción del aceite esencial. En total se recolectará aproximadamente 10 Kg. de materia prima de cada especie vegetal.

##### **3.3.1.2 Identificación taxonómica.**

Se llevó una muestra de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) al Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su identificación por los profesionales del área.

##### **3.3.1.3 Obtención del aceite esencial**

La obtención del aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys mollis* (Muña) se efectuó con el método de hidrodestilación, que es el más recomendable por usar ningún solvente. Después de la condensación, el destilado se recibirá en un depósito estéril y cerrado, aquí se observó un estado difásico entre agua y aceite esencial, debido a la diferencia de densidades, se recogió en una pera de decantación y separó el aceite esencial del agua, para quitar el exceso de humedad del aceite esencial se trató con sulfato de sodio anhidro. El aceite se depositó en un frasco ámbar estéril y se dejó en refrigeración.



### 3.3.2 Obtención de los microorganismos de prueba.

#### 3.3.2.1 Activación de las cepas ATCC

Para las cepas de *S. aureus* ATCC 6538, *K. pneumoniae* ATCC 10031, de *C. albicans* ATCC 10231, se procedió a la activación según las recomendaciones del fabricante.

#### 3.3.3. Formulación del colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña)

La composición del desinfectante fue la siguiente:

• H <sub>2</sub> O	csp. 100g
• Aceite esencial de <i>Eucalyptus globulus Labill</i>	8g
• Aceite esencial de <i>Minthostachys sp.</i>	8g
• Polisorbato 20	5g
• Glicerina	10g
• Metilparabeno sódico	0.04g
• Propilparabeno sódico	0.015g

#### 3.3.4. Preparación del colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña)

1.- En un beacker se mezcló el aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* y el aceite esencial de *Minthostachys sp.*, luego se adicionó el polisorbato 20.

2.- En otro Beacker se mezcló el agua y el metilparabeno sódico y el propilparabeno sódico.

3.- Se unió las dos mezclas antes mencionadas y se agitó vigorosamente.

### **3.3.5. Evaluación de la efectividad antimicrobiana del colutorio por el Método Reto Microbiano Modificado<sup>35</sup>**

#### **3.3.5.1. Principio del ensayo**

El método se basa en determinar el porcentaje de reducción de las poblaciones microbianas enfrentadas con un germicida a la concentración y tiempo de contacto recomendada por el fabricante.<sup>35</sup>

#### **3.3.5.2. Procedimiento del método de ensayo**

1.- Se realizó una siembra de cada microorganismo dos días antes de realizar la prueba. Esta siembra se realizó: para bacterias en Tipticasa Soya Agar y para hongos en Agar Papa Dextrosa.

2.- El día de la prueba se preparó una suspensión de cada grupo microbiano, teniendo en cuenta que se deseaba obtener un promedio de cuenta microbiana de  $10 \times 10^9$  UFC/mL.

3.- Se verificó por recuento en placa la concentración del inóculo para cada microorganismo.

4.- Se tomó 1 mL de la suspensión microbiana y se llevó a un frasco conteniendo 99 mL de la muestra a evaluar y agitó en el vortex, se dejó reposar por 30 segundos.

5.- Se tomó 1 mL de la mezcla anterior y se colocó en un tubo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante, se homogenizó y se dejó actuar por 30 segundos.

6.- Luego se realizaron las diluciones con buffer fosfato diluido hasta  $10^{-7}$ .

7.- Para cada dilución se sembró una alícuota de 1 mL y 0.1 mL según corresponda en placas petri, luego se agregó de 12 a 15 mL de agar (Bacterias: agar cuenta estándar; Hongos: APD con neutralizante)

El mismo procedimiento se realizó para el control positivo, reemplazando en el procedimiento a la muestra.<sup>35</sup>

### 3.3.5.3. Calculo del porcentaje de reducción

Se realiza aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - (B \times 100) / A$$

Donde:      A = Cuenta inicial

              B = Cuenta obtenida

### 3.4. Procesamiento de datos

Se realizó el llenado de los resultados en la ficha de recolección de datos en Excel 2013.

Se transportó los datos de los resultados al programa R-Project y Minitab para su análisis estadístico.

### 3.5. Análisis de datos

Se realizó los siguientes análisis estadísticos:

**Shapiro-Wilk:** Prueba de Normalidad

**Prueba de T de student:** para análisis de comparación del tratamiento más efectivo

**Análisis de las variables:** Se elaboró tabla de medidas y gráficos descriptivos.

**Prueba de Bartlett:** Para homogeneidad de variancia.

**Identificación de datos atípicos:** Para identificar algún dato atípico.

**Prueba de Wilcoxon – no paramétrica:** para análisis de comparación del tratamiento más efectivo.

#### IV. RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de *Staphylococcus aureus*

<i>Staphylococcus aureus</i>	RÉPLICAS	RESULTADO	REDUCCIÓN PORCENTUAL	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA
Recuento inicial	A	1.00E+10		
	B	9.00E+09		
	C	9.00E+09		
Recuento de colutorio de aceites esenciales	A	9.50E+07	99.05	2.02
	B	7.20E+07	99.20	2.10
	C	7.80E+07	99.13	2.06
Recuento de Control positivo	A	7.80E+07	99.22	2.11
	B	8.10E+07	99.10	2.05
	C	7.70E+07	99.14	2.07

Tabla 2. Resultados de *Klebsiella pneumoniae*

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RÉPLICAS	RESULTADO	REDUCCIÓN PORCENTUAL	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA
Recuento inicial	A	2.10E+09		
	B	1.50E+09		
	C	1.90E+09		
Recuento de colutorio de aceites esenciales	A	3.00E+06	99.86	2.85
	B	4.00E+06	99.73	2.57
	C	4.00E+06	99.79	2.68
Recuento de Control positivo	A	6.00E+07	97.14	1.54
	B	4.60E+07	96.93	1.51
	C	4.70E+07	97.53	1.61

Tabla 3. Resultados de *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>	RÉPLICAS	RESULTADO	REDUCCIÓN PORCENTUAL	REDUCCIÓN LOGARÍTMICA
Recuento inicial	A	2.00E+08		
	B	2.00E+08		
	C	2.00E+08		
Recuento de colutorio de aceites esenciales	A	2.00E+03	99.99	5.00
	B	2.00E+03	99.99	5.00
	C	2.00E+03	99.99	5.00
Recuento de Control positivo	A	9.10E+05	99.55	2.34
	B	7.40E+05	99.63	2.43
	C	8.60E+05	99.57	2.37

**Tabla 4. Estadística descriptiva para *Klebsiella pneumoniae***

tratamiento	N	Cantidad Media Bacteriana	Desv.Est.	Error Estándar de la media	Media de Reduccion bacteriana	Media de Reducción porcentual	Intervalo de confianza t-student
<i>klebsiella pneumoniae</i> y colutorio	3	1829666667	305941716	176635532	9.258122786	99.79331662	[-3.092407 ; -2.094259]
Colutorio comercial	3	1782333333	299323125	172814287	9.246689998	97.20083542	

**Tabla 5. Estadística descriptiva para *Staphylococcus aureus***

tratamiento	N	Cantidad Media Bacteriana	Desv.Est.	Error Estándar de la media	Media logaritmica de Reduccion bacteriana	Media de Reducción porcentual	Intervalo de confianza t-student log(Reduccion)
<i>Staphylococcus aureus</i> y colutorio	3	9251666667	565811217	333668665	9.965690293	99.12777778	[-0.0654 ; 0.0654]
Colutorio comercial	3	9254666667	577931080	333668665	9.96580876	99.15481481	

**Tabla 6. Estadística descriptiva para *Candida albicans***

tratamiento	N	Cantidad Media De levaduras	Desv.Est.	Error Estándar de la media	Media logaritmica de Reduccion De levaduras	Media de Reducción porcentual	Intervalo de confianza t-student log(Reduccion)
<i>Candida albicans</i> y colutorio	3	199998000	305941716	176635532	5	99.999	[0.34992 ; 0.48340]
Colutorio comercial	3	199163333.3	299323125	172814287	2.380106141	99.58166667	

#### 4.1. RESULTADOS PARA *Klebsiella pneumoniae*

##### a. SUPUESTO DE NORMALIDAD

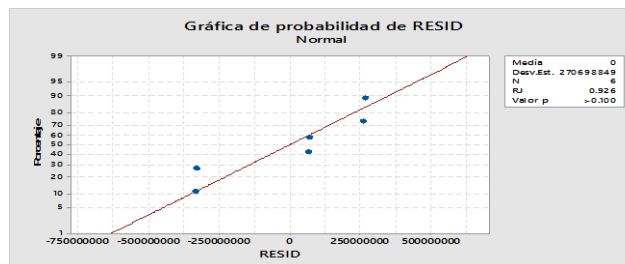
Planteamiento de Hipótesis:

$H_0$ : Los errores se distribuyen normalmente

$H_1$ : Los errores no se distribuyen normalmente

$\alpha = 0.05$

**p-valor = 0.100 >  $\alpha = 0.05$**



**Grafico 1. Gráfico de análisis de normalidad para *Klebsiella pneumoniae*. (Minitab)**

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se puede rechazar que los errores se distribuyen normalmente.

**b. PRUEBA DE BARTLETT PARA HOMOGENEIDAD DE VARIANZA**

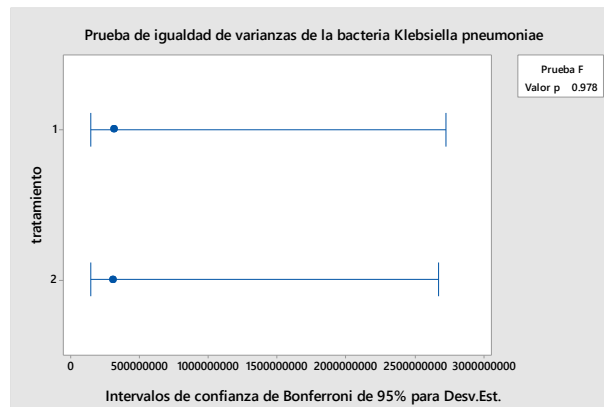
Planteamiento de Hipótesis:

$$H_0 : \sigma_A^2 = \sigma_B^2 = \sigma_C^2 = \sigma_D^2$$

$$H_a : \text{Al menos dos } \sigma_i^2 \text{ son diferentes}$$

$\alpha = 0.05$

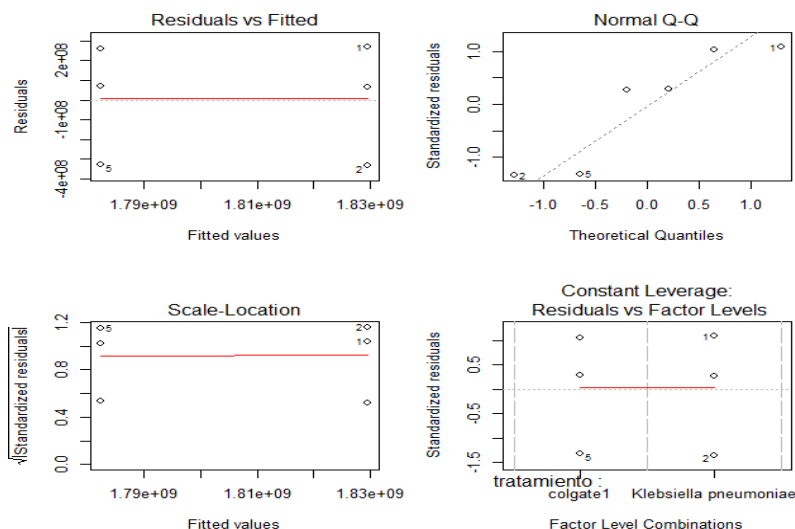
**p-valor = 0.978** >  $\alpha = 0.05$



**Grafico 2. Gráfico de prueba de igualdad de varianza para *Klebsiella pneumoniae* con ambos tratamientos. (Minitab)**

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se puede rechazar que las varianzas de los tratamientos son homogéneas. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas.

lm(Reduccion ~ tratamiento)



**Grafico 3. Gráfico de diagnóstico de supuestos para *Klebsiella pneumoniae*. (R Project)**

### c. SHAPIRO-WILK NORMALITY TEST

W = 0.82955, p-value = 0.1065

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se puede rechazar que los errores se distribuyen normalmente.

### d. NON-CONSTANT VARIANCE SCORE TEST

Chisquare = 0.001434556 Df = 1 p = 0.9697869

**Conclusión:** A un nivel de significación de 0.05, no se puede rechazar que las varianzas de los tratamientos son homogéneas

### e. IDENTIFICACIÓN DE DATOS ATÍPICOS

student unadjusted	p-value	Bonferonni p
2 -1.585142	0.21111	NA

**Conclusión:** A un nivel de significación de 0.05, no se acepta la presencia de algún dato atípico entre las 3 repeticiones

### f. PRUEBA DE t-student.

Planteamiento de hipótesis:

H<sub>0</sub>: El tratamiento con el colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) tiene el mismo efecto que colutorio comercial.

#### Two Sample t-test

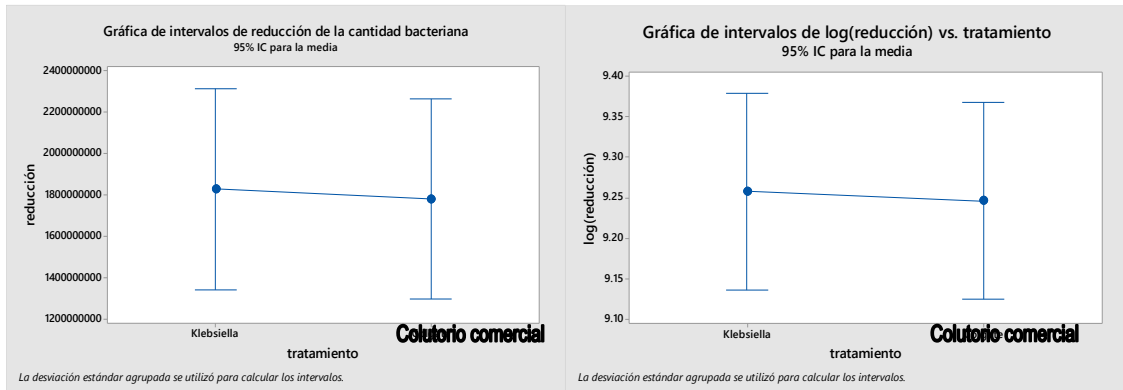
t = -0.15768, df = 4, p-value = 0.4412 -Inf 0.1252038

Ejemplo de estimados:

Porcentaje en colutorio Comercial	Porcentaje en grupo <i>Klebsiella p.</i>
9.246667	9.256667

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, se acepta la hipótesis planteada que nos dice que el tratamiento con el colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) tiene el mismo efecto que colutorio comercial.

Diferencia mínima entre medias de 9.24 para el colutorio comercial y de 9.26 para el tratamiento con el colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña)



**Grafico 4. Intervalos de reducción de *Klebsiella pneumoniae* en reducción de porcentaje y reducción logarítmica (R-Project)**

## 4.2. RESULTADOS PARA *Staphylococcus aureus*

### a. SUPUESTO DE NORMALIDAD

#### Planteamiento de Hipótesis:

$H_0$ : Los errores se distribuyen normalmente

$H_1$ : Los errores no se distribuyen normalmente

$$\alpha = 0.05$$

#### Shapiro-Wilk normality test

$$W = 0.64967, \text{ p-value} = 0.001745 < \alpha = 0.05$$

Al realizar la transformación logarítmica,

#### Shapiro-Wilk normality test

$$W = 0.63989, \text{ p-value} = 0.001351 < \alpha = 0.05$$

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, se rechaza que los errores se distribuyen normalmente.



## b. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZA

Planteamiento de hipótesis:

$$H_0 : \sigma_A^2 = \sigma_B^2 = \sigma_C^2 = \sigma_D^2$$

$H_a$  : Al menos dos  $\sigma_i^2$  son diferentes

$\alpha = 0.05$

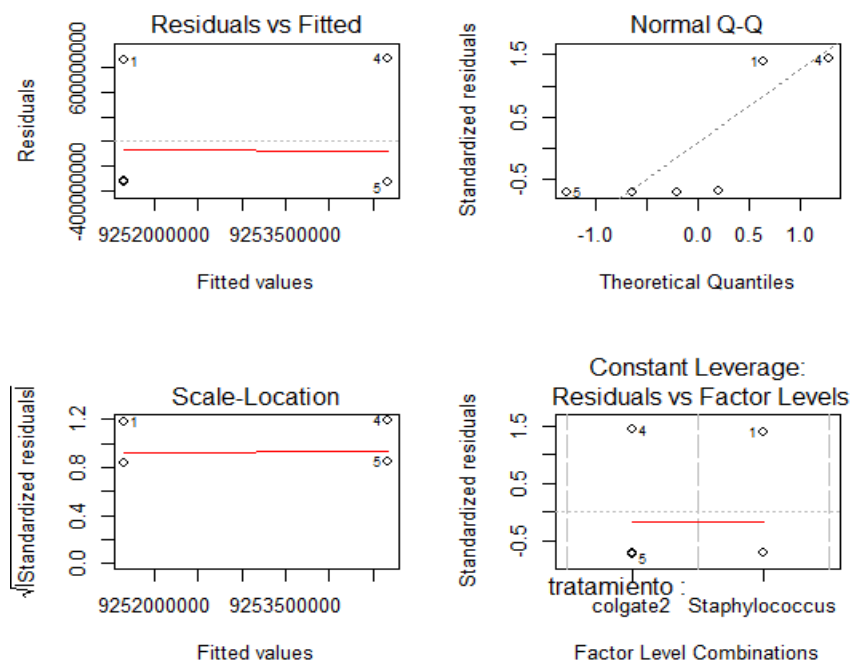
**Non-constant Variance Score Test**

Chisquare = 0.001347171 Df = 1 **p = 0.9707212** >  $\alpha = 0.05$

Al realizar la transformación logarítmica,

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se puede rechazar que las varianzas de los tratamientos son homogéneas. Se cumple el supuesto de homogeneidad de varianzas.

lm(Reducion ~ tratamiento)



**Grafico 5. Gráfico de diagnóstico de supuestos para *Staphylococcus aureus*. (R Project)**

### c. IDENTIFICACIÓN DE DATOS ATÍPICOS

student unadjusted	<b>p-value</b>	Bonferonni p
4 1.76913	<b>0.17502</b>	NA

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se acepta la presencia de algún dato atípico entre las 3 repeticiones

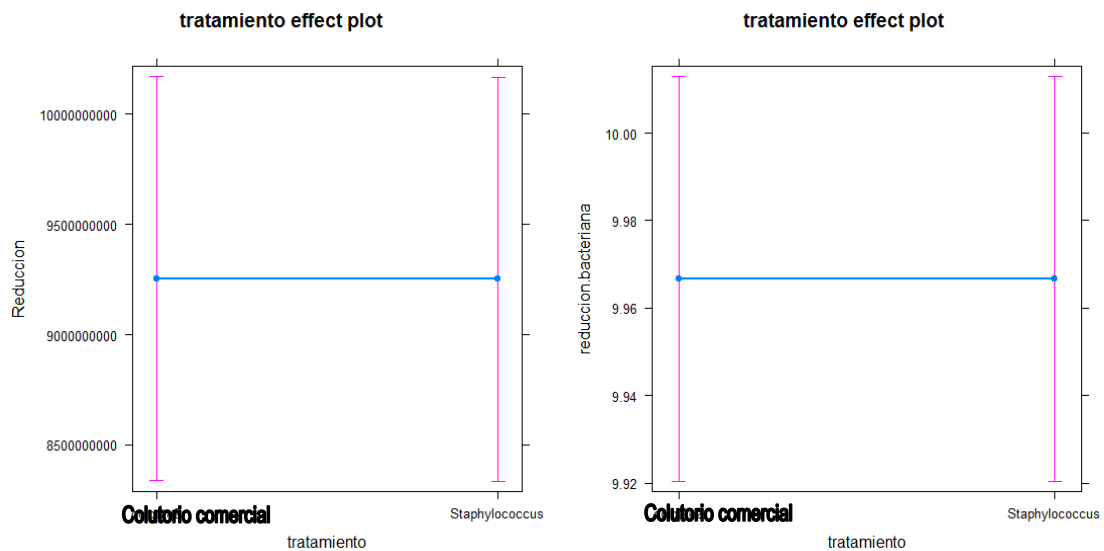
### d. PRUEBA DE WILCOXON – NO PARAMÉTRICA

**Planteamiento de hipótesis:**

H<sub>0</sub>: El tratamiento con el colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) tiene el mismo efecto que colutorio comercial.

W = 4.5,                      **p-value = 0.6039**

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se acepta que el tratamiento con el colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) tiene el mismo efecto que colutorio comercial., ambos presentan la misma efectividad



**Grafico 6. Intervalos de reducción de *Staphylococcus aureus* en reducción de bacteriana y reducción logarítmica (R-Project)**

## 4.2. RESULTADOS PARA *Candida albicans*

### a. SUPUESTO DE NORMALIDAD

Planteamiento de Hipótesis:

$H_0$ : Los errores se distribuyen normalmente

$H_1$ : Los errores no se distribuyen normalmente

$\alpha = 0.05$

Shapiro-Wilk normality test

$W = 0.8792$ , **p-value = 0.2654** >  $\alpha = 0.05$

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se puede rechazar que los errores se distribuyen normalmente.

### b. PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZA

Planteamiento de Hipótesis:

$$H_0 : \sigma_A^2 = \sigma_B^2 = \sigma_C^2 = \sigma_D^2$$

$H_a$  : Al menos dos  $\sigma_i^2$  son diferentes

$\alpha = 0.05$

Non-constant Variance Score Test

Chisquare = 3 Df = 1 **p = 0.08326452** >  $\alpha = 0.05$

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, no se puede rechazar que las varianzas de los tratamientos son homogéneas

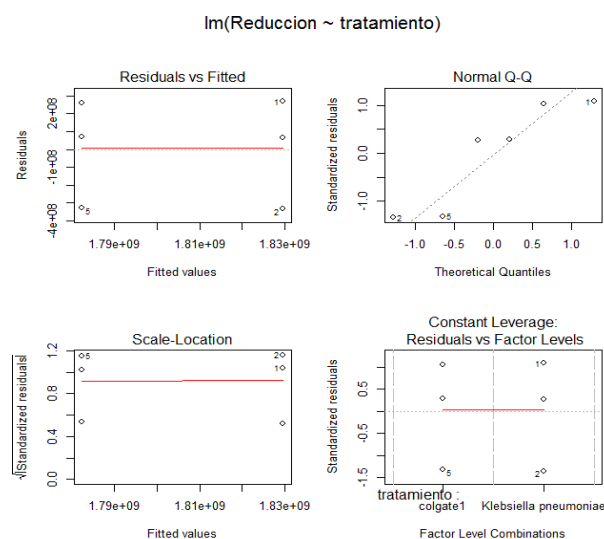


Grafico 7. Gráfico de diagnóstico de supuestos para *Candia albicans*. (R Project)

### c. IDENTIFICACIÓN DE DATOS ATÍPICOS

student unadjusted	<b>p-value</b>	Bonferonni p
5	5.8	0.070199
		0.081194

Conclusión: A un nivel de significancia de 0.05, no se acepta la presencia de algún dato atípico entre las 3 repeticiones

### d. PRUEBA DE t-student

#### Planteamiento de hipótesis:

H<sub>1</sub>: El tratamiento aplicado con el colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) a *Candida albicans* reduce mejor la cantidad logarítmica que el colutorio comercial

#### Two Sample t-test

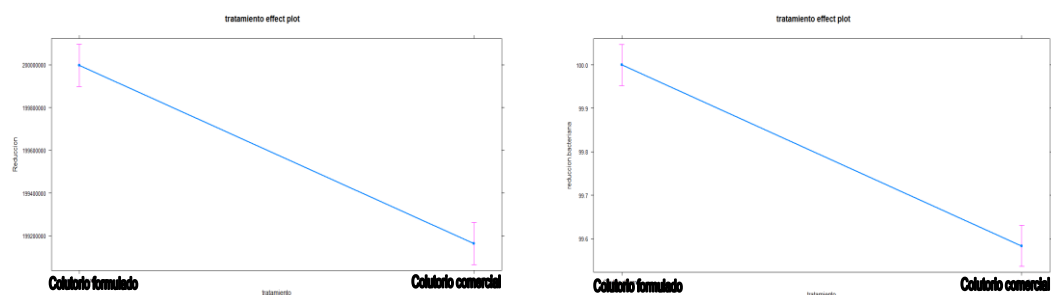
t = 17.334, df = 4, **p-value = 0.0000325** <  $\alpha = 0.05$

Porcentaje en grupo Tratamiento  
100.00000

Porcentaje en grupo Colutorio comercial  
99.58333

**Conclusión:** A un nivel de significancia de 0.05, se acepta que El tratamiento aplicado con el colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp* (Muña) a *Candida albicans* reduce mejor la cantidad logarítmica que el colutorio comercial.

Diferencia entre medias de 99.583 para el colutorio comercial y de 100.00 para el tratamiento.



**Gráfico 8. Intervalos de reducción de *Candida albicans* en reducción de levaduras y reducción logarítmica (R-Project)**

## V. DISCUSION

Los resultados de la reducción logarítmica microbiana para microorganismo de prueba enfrentado al colutorio formulado y al colutorio comercial con un  $\alpha=0.05$  fue de similar eficacia estadística para *Klebsiella pneumoniae* con un  $p$ -valor=0.4412 y *Staphylococcus aureus* con un  $p$ -valor=0.6039, mientras que para *Candida albicans* se demostró una mejor eficacia significativa, manifestada en una mayor reducción de la población microbiana con un  $p$ -valor=0.0000325. Con ello se demuestra que el colutorio formulado en la presente investigación posee una mejor efectividad antifúngica.

Saguma en su investigación "Sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*"<sup>11</sup>, demuestra que el *Staphylococcus aureus* es más sensible a las concentraciones de 75 y 100% del aceite esencial en relación a la Vancomicina, sin embargo en la presente investigación se demostró que a una concentración de 8% de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* se obtienen buenos resultados frente a *Staphylococcus aureus*. Esto puede explicarse por la existencia de un efecto sinérgico entre los aceites esenciales presente en la formulación, dado entre los aceites de *Eucalyptus globulus* y *Minthostachys sp.* Con esto se confirma lo manifestado por Mendez en su investigación "Efecto sinérgico in vitro de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare* sobre *Escherichia coli*"<sup>10</sup>, donde demostró la existencia del efecto sinérgico entre los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare*, en la cual usando mínimas concentraciones (5 $\mu$ L de la combinación de ambos) de los aceites esenciales frente a *Escherichia coli* reportó alta sensibilidad según la escala de Duraffourd.

Con respecto a la efectividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*, demostrada en la presente investigación, en la que se obtuvo buenos resultados significativos estadísticamente con un  $p$ -valor=0.0000325, comparado con el colutorio comercial, este resultado confirma los obtenidos por De Siqueira *et al* en su investigación "Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xylitol and papain: a pilot study"<sup>2</sup>, en la cual demuestra que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* tiene actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*. Igualmente podemos mencionar que se

confirma los resultados de la investigación de Salas “Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*. Puno – 2015”<sup>12</sup>, quien demuestra un buen efecto antimicótico de *Minthostachys mollis* a una concentración de 1mL/250µL de aceite esencial en agua destilada.

Otros estudios también confirman la acción antimicrobiana del aceite esencial de *Eucalyptus Globulus*, como lo manifestado por Cuellar *et al* <sup>36</sup>, quienes afirman que el aceite de *Eucalyptus Globulus* posee efecto antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, y que además manifiestan que se muestra mayor actividad antimicrobiana en las diluciones que en los aceites puros, como también se demuestra en la presente investigación en la cual se utilizó el aceite esencial de *Eucalyptus Globulus* a una concentración final de 8% en la formulación.

El efecto antibacteriano del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* sobre *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, se podría fundamentar en los principales activos antibacterianos: eucaliptol, flavonoides, eucaliptina y taninos, compuestos que en conjunto poseen propiedades bactericidas y antifúngicas.<sup>37</sup> Para el caso del aceite esencial de *Minthostachys sp.* Fuentes *et al* <sup>38</sup> reporta que el contenido de timol, acetato de timol y metileugenol posiblemente sean los responsables de la actividad antimicrobiana de esta especie vegetal.

## VI. CONCLUSIONES

- 1.- Se evaluó la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231, demostrándose su efectividad antimicrobiana al obtener un promedio de porcentaje de reducción de 99.79 para *Klebsiella pneumoniae*, 99.13 para *Staphylococcus aureus* y 99.99 para *Candida albicans*.
  
- 2.- Se comparó los resultados de la efectividad antimicrobiana obtenidos del colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y *Candida albicans* ATCC 10231 con los resultados del colutorio comercial, demostrándose estadísticamente con la prueba t-student con un p-valor de 0.0000325 y un nivel de significancia de 0.05, que el colutorio a base de los aceites esenciales presenta mayor efectividad antimicrobiana que el colutorio comercial frente a *Candida albicans*,
  
- 3.- Al determinar la efectividad antimicrobiana de un colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) se obtuvo una reducción logarítmica promedio en relación con su recuento inicial de 2.06 para *Staphylococcus aureus*, 2.7 para *Klebsiella pneumoniae* y 5.0 para *Candida albicans*.

## VII. RECOMENDACIONES

- 1.- Se recomienda buscar métodos para mejorar las condiciones organolépticas de olor y sabor del colutorio a base de aceite esencial de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña).
- 2.- Se recomienda investigar el aporte del aceite esencial de *Erythroxylum coca* a la efectividad antimicrobiana del colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña).
- 3.- Debe investigarse la efectividad antimicrobiana del colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) frente a otros microorganismos causantes de infecciones bucales.
- 4.- El colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña) debe ser sometido a ensayos de estabilidad normal y acelerada para así asegurar la calidad del producto.



## VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1.- Carretero Peláez M<sup>a</sup> Ángeles, Esparza Gómez Germán C., Figuero Ruiz Elena, Cerero Lapiedra Rocio. Colutorios con alcohol y su relación con el cáncer oral: Análisis crítico de la literatura. Med. oral patol. oral cir. Bucal [Internet] 2004 [citado 4 de setiembre del 2017]; 9(2): 116-123. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1698-44472004000200003&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-44472004000200003&lng=es).
- 2.- De Siqueira Mota Valéria, Turrini Ruth Natalia Teresa, Poveda Vanessa de Brito. Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus oil, xylitol and papain: a pilot study. Rev. esc. enferm. USP [Internet]. 2015 [Citado 11 de setiembre de 2017]; 49(2): 0216-0220 p. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0080-62342015000200216](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342015000200216)
- 3.- Cruzado Donato J. Concentración inhibitoria mínima “in vitro” del *Mintostachys mollis* (muña) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 35668. [Tesis de pregrado en internet]. Trujillo-Perú:Universidad Nacional de Trujillo; 2014 [Citado 24 de setiembre del 2017]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/571>
- 4.- Morales Trejo B., Rocha Navarro M.L., Microbiología oral pre y postextracción profiláctica transalveolar de terceros molares. Revsita ADM [Internet] 2008 [Citado el 24 de setiembre del 2017]; 65(4): 189-194. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2008/od084e.pdf>
- 5.- Alejandro Serrano-Coll Héctor, Sánchez-Jiménez Miryan, Cardona-Castro Nora. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. CES Odontol [Internet] 2015 [Citado 24 de setiembre del 2017]; 28(2): 112-118. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v28n2/v28n2a09.pdf>
- 6.- Prieto Prieto José, Calvo Almudena. Bases microbiológicas en las infecciones bucales y sensibilidad en los antibióticos. Med Oral Patol Oral Cir Bucal

- [Internet] 2004 [Citado el 24 de setiembre del 2017]; 9: 11-18. Disponible en: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v9Suppli/medoralv9supplip15.pdf?rel=0>
- 7.- Jiménez Y, Vicente Bagán J, Murillo J, Poveda R. Infecciones odontogénicas. Complicaciones. Manifestaciones sistémicas. Med Oral Patol Oral Cir Bucal [Internet] 2004 [Citado el 24 de setiembre del 2017]; 9: 139-147. Disponible en: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v9Suppli/medoralv9supplip143.pdf>
- 8.- Lopez A, Plascencia M, Lizardi J, Rosas E, Luque A, Cortez M. Antifungal and antimycotoxigenic activity of essential oils from *Eucalyptus globulus*, *Thymus capitatus* and *Schinus molle*. *Food Sci. Technol (Campinas)* [Internet]. 2015 [Consultado 26 de setiembre del 2017]; 35(4):664-671 p. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612015000400664](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612015000400664)
- 9.- Lorca Salañer Amparo, Carrasquer Burguesa Assumpta. Efecto local de los colutorios con contenido alcohólico: revisión de la literatura. RCOE [Internet]. 2005 [citado 24 de setiembre del 2017]; 10(4): 407-412. Disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1138-123X2005000400003&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138-123X2005000400003&lng=es).
- 10.- Méndez Cépeda K. Efecto sinérgico in vitro de aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Origanum vulgare* sobre *Escherichia coli*. [Tesis de pregrado en internet]. Trujillo-Perú:Universidad Nacional de Trujillo; 2016 [Citado 24 de setiembre del 2017]. Disponible en: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/97750>
- 11.- Saguma M. Sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*. [Tesis de pregrado en internet]. Trujillo-Perú:Universidad Nacional de Trujillo; 2016 [Citado 24 de setiembre del 2017]. Disponible en: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/98282>

- 12.- Salas Apaza A. Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*. Puno – 2015. [Tesis de pregrado en Internet]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2016 [Citado 24 de setiembre del 2017]. Disponible en: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3339>
- 13.- Acho AG, Rodríguez I. Actividad antibacteriana in vitro de los extractos acuosos liofilizados de hojas de *Eucalyptus globulus* Labill y cortezas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume. IMET-EsSalud, 2012. [Tesis de pregrado en Internet]. Iquitos-Perú: Universidad de la Amazonia Peruana; 2014 [Citado 24 de setiembre del 2017]. 101 p. Disponible en: <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/UNAP/2524>
- 14.-Alvarado JE, Vásquez VH. Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" a diferentes concentraciones, en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis. [Tesis de pregrado en internet]. Chiclayo-Peru:Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2014 [Citado 24 de setiembre del 2017]. Disponible en: [http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPRG\\_e04e318dcd79bd3b52d07e97b662185d](http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPRG_e04e318dcd79bd3b52d07e97b662185d)
- 15.- Morales Castillo P. Efecto in vitro del aceite esencial del *Eucalyptus globulus* (eucalipto) en diferentes concentraciones sobre cepas estandarizadas del *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [Tesis de pregrado en internet]. Trujillo-Peru:Universidad Nacional de Trujillo; 2014 [Citado 24 de setiembre del 2017]. Disponible en: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/95140>
- 16.- Ccallo Laucata Sofia N. Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial del *Minthostachys Mollis* (Muña), Frente a la Actividad Bacteriana de *Streptococcus Mutan* y *Porphyromonas Gingivalis*.Puno 2013. [Tesis de pregrado en internet]. Puno: Universidad Nacional del altiplano; 2013 [Citado 24 de setiembre del 2017]. Disponible en: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/1905/Ccallo\\_Laucata\\_Sofia\\_Nancy.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/1905/Ccallo_Laucata_Sofia_Nancy.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

- 17.- kuklinski koepl C. Farmacognosia. Estudios de las Drogas y Sustancias medicamentosas de origen natural. 1ra ed. Barcelona: Editorial Omega; 2003
- 18.- Gonzalez Villa A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del amazonas. [Trabajo final en internet] Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2004 [Citado el 24 de setiembre del 2017]. 100 p. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>
- 19.- Bruneton J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2da ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 2001
- 20.- Azaña Espinoza I. Efectividad Antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. [Tesis de pre grado en internet]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010 [Citado 10 de octubre del 2017]. 168 p. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/2183>
- 21.- Huari Guerrero G. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *minthostachys mollis* (muña) en *streptococcus Mutans*. [Tesis de pregrado en Internet]. Lima-Perú: Universidad Mayor de San Marcos; 2014 [Citado 10 de octubre del 2017]. 97p. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3680/1/Huari\\_gg.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3680/1/Huari_gg.pdf)
- 22.- Naverac Aznar M., De Grado Cabanilles P., Gil Loscos F. Periodoncia para el Higienista Dental. Periodoncia y Osteointegración [Internet] 2007 [Consultado el 25 de setiembre del 2017]; 17(1): 41-42. Disponible en: [https://www.sepa.es/images/stories/SEPA/REVISTA\\_PO/articulos.pdf/17-1\\_04.pdf](https://www.sepa.es/images/stories/SEPA/REVISTA_PO/articulos.pdf/17-1_04.pdf)
- 23.- López Jarnet P., Henarejas Hernández JL. , Saura Pérez M., Camacha Alansa F. Efectos de los diferentes colutorios para el tratamiento de la halitosis oral. Av Odontoestomatol [Internet] 2003 [Consultado el 25 de setiembre del 2017]; 19(6): 275-282. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v19n6/original2.pdf>

- 24.- Velasco del Castillo t., Pizarro Garcia G. Variación del pH salival al usar colutorio con y sin alcohol en el personal de la Fuerza Aérea del Perú, Iquitos-2016. [Tesis de pregrado en Internet] Iquitos: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2016 [Citado el día 26 de setiembre del 2017]. 74 p. Disponible en:  
<http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3873/TESIS%20Pdf.pdf?sequence=1>
- 25.- García-García V., Bascones Martínez A. Cáncer oral: Puesta al día. Av Odontoestomatol [Internet]. 2009 [citado 25 de setiembre del 2017]; 25(5): 239-248. Disponible en:  
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0213-12852009000500002&lng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852009000500002&lng=es).
- 26.- Liébana Ureña J. Microbiología oral. 2da ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 2002.
- 27.- Agurto Saenz T. Tópicos Básicos en Microbiología. 1ª Ed. Perú: Wari S.AC.; 2016. p 214.
- 28.- Lopardo Horacio, Predari Silvia, Vay Carlos, editores. Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología: Bacterias de Importancia Clínica. 1ª Ed. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología; 2016.
- 29.- Medina Ardila. Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. Rev. Av Periodoncia [Internet] 2010 [Consultado el 13 de octubre del 2017]; 22(1). Disponible en:  
[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1699-65852010000100004](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852010000100004)
- 30.- Juan J. Camarena, Roberto Sánchez. Infección por Staphylococcus aureus resistente a metilina [Internet]. Valencia: Control Calidad SEIMC [Consultado el 13 de octubre del 2017]. Disponible en:  
<https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>

- 31.- Zendejas Manzo G., Avalos-Flores H., Soto Padilla M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Rev Biomed [Internet] 2014 [Consultado el 14 de octubre del 2017]; 25(3): p. 129-143. Disponible en: <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>
- 32.- Carranza Alfonso, Rivera Patricia, Gutiérrez Rafael, Hernández Francisco. Endocarditis aguda estafilococcica fatal con periodontitis severa. Rev. costarric. cienc. méd [Internet]. 2000 [Citado el 13 de octubre del 2017]; 21(3-4): 171-177. Disponible en: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-29482000000200006&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-29482000000200006&lng=en).
- 33.- Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. Microbiología médica. 8va. Ed. España: Elsevier. 2017
- 34.- Aguirre Urizar José M. Candidiasis orales. Rev Iberoam Micol [Internet] 2002 [Consultado el 19 de octubre del 2017]; 19: 17-21. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/2002-19/017021.pdf>
- 35.- Giles M., Ortegón A., Palao M. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. Facultad de Química - UNAM. México D.F.; 2009
- 36.- Cuellar A. Evaluación del rendimiento y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Eucalyptus glubulus*, *Cymbopogon citratus* y *Rosmarinus officinales* en el distrito de Mbarara (Uganda). Universidad de Ciencia y tecnología de Uganda.
- 37.- Dueñas R. Eucalipto compuesto, Laboratorio de Remedios Herbolarios. [Citado el 16 de octubre del 2017]. Disponible en: [http://www.redsa.com.mx/index\\_htm\\_files/Eucalipto%20Compuesto.pdf](http://www.redsa.com.mx/index_htm_files/Eucalipto%20Compuesto.pdf)
- 38.- Fuentes C. Murguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Mintostachys mollis* (Kunth) Griseb “muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas- Rev. Ciencia e investigación 2001; VI(1): 23-39.

## ANEXOS

### ANEXO 1. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

Tabla 7. Operacionalización de variables

VARIABLE	OPERACIONALIZACION DE VARIABLES			
	Indicador	Instrumento	Escala	Fuente
Reducción de colonias de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Crecimiento microbiano	Técnica de recuento en placa por incorporación	UFC	Placas Petri con cultivos de <i>S. aureus</i> ATCC 6538
Reducción de colonias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	Crecimiento microbiano	Técnica de recuento en placa por incorporación	UFC	Placas Petri con cultivos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031
Reducción de colonias de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	Crecimiento microbiano	Técnica de recuento en placa por incorporación	UFC	Placas Petri con cultivos <i>C. albicans</i> ATCC 10231

### ANEXO 2. Materiales y equipos

#### Materiales y equipos para extraer los aceites esenciales

- Hojas frescas de muña
- Hojas frescas de eucalipto
- Balanza
- Refrigeradora
- Balón de fondo plano de 500mL
- Soporte Universal

- Refrigerante de bolas o serpentín
- Vaso de precipitado
- Agua destilada
- Mangueras
- Mechero de bunsen
- Trípode
- Rejilla de asbesto

**Materiales y equipos para la preparación y activación de los microorganismos de prueba.**

- Medios de cultivo:
  - Agar Tripticasa de soya
  - Agar Papa Dextrosa con neutralizante
  - Agar cuenta estándar
- Lecitina
- Tween 80
- Balanza
- Agua destilada
- Probetas
- Matraz de Erlenmeyer estéril
- Placas petri estériles
- Pipetas estériles
- Esterilizador de calor seco (horno)
- Autoclave
- Mecheros
- Estufa (incubadora)
- Microscopio
- Refrigeradora
- Tubos de ensayo.
- Guantes
- Propipeta
- Frascos de tapa azul de 500mL
- Asa de siembra



**Materiales y equipos para la preparación del colutorio a base de los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus Labill* (Eucalipto) y *Minthostachys sp.* (Muña)**

- Beacker de 50, 100 y 500 mL
- Baguetas
- Probetas de 50, 100 y 250 mL
- Agua destilada
- Potenciómetro
- Envase de color ámbar
- Cocinilla eléctrica
- Balanza de precisión
- Luna de reloj
- Polisorbato 20

**Materiales y equipos para la Evaluación de la actividad antibacteriana del desinfectante.**

- Agar Tripticasa de Soya
- Agar Papa Dextrosa
- Buffer fosfato 0.25M
- Neutralizante
- Agua destilada
- Placas petri estériles
- Pipetas estériles
- Agitador magnético (Vortex)
- Tubos de ensayo estériles
- Gradillas de metal para tubos
- Mecheros
- Propipeta
- Incubadora de 32,5°C  $\pm$  2°C
- Espectrofotómetro
- Celdas para espectrofotómetro

ANEXO 3. Ficha de recolección de datos

Tabla 8. Resultados de *Candida albicans*

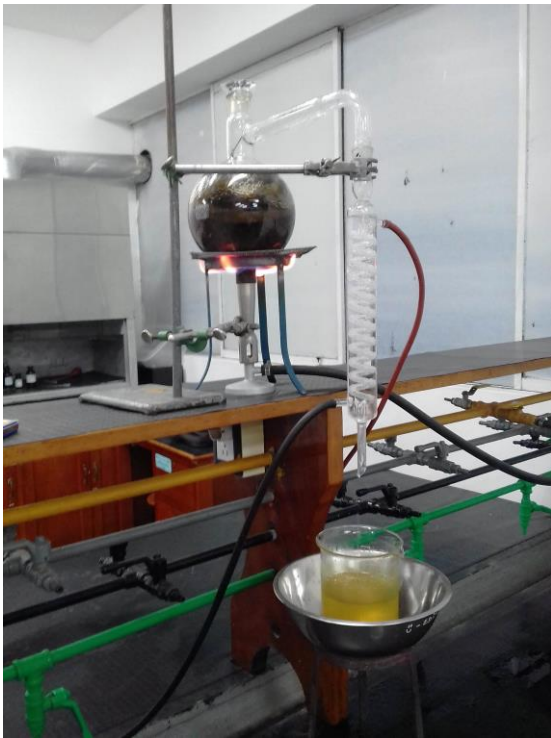
<i>cepa de ensayo</i>	<i>tratamiento</i>	Replicas	Resultado (log)	Reducción porcentual
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SIN TRATAMIENTO	1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SIN TRATAMIENTO	2		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SIN TRATAMIENTO	3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CON TRATAMIENTO	1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CON TRATAMIENTO	2		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CON TRATAMIENTO	3		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CONTROL	1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CONTROL	2		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CONTROL	3		
<i>Staphylococcus aureus</i>	SIN TRATAMIENTO	1		
<i>Staphylococcus aureus</i>	SIN TRATAMIENTO	2		
<i>Staphylococcus aureus</i>	SIN TRATAMIENTO	3		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CON TRATAMIENTO	1		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CON TRATAMIENTO	2		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CON TRATAMIENTO	3		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CONTROL	1		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CONTROL	2		
<i>Staphylococcus aureus</i>	CONTROL	3		

<i>Candida albicans</i>	<b>SIN TRATAMIENTO</b>	<b>1</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>SIN TRATAMIENTO</b>	<b>2</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>SIN TRATAMIENTO</b>	<b>3</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>CON TRATAMIENTO</b>	<b>1</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>CON TRATAMIENTO</b>	<b>2</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>CON TRATAMIENTO</b>	<b>3</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>CONTROL</b>	<b>1</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>CONTROL</b>	<b>2</b>		
<i>Candida albicans</i>	<b>CONTROL</b>	<b>3</b>		

**ANEXO 4. Procesamiento de extracción de los aceites esenciales.**



**Figura 1.** Extracción del aceite esencial del eucalipto.

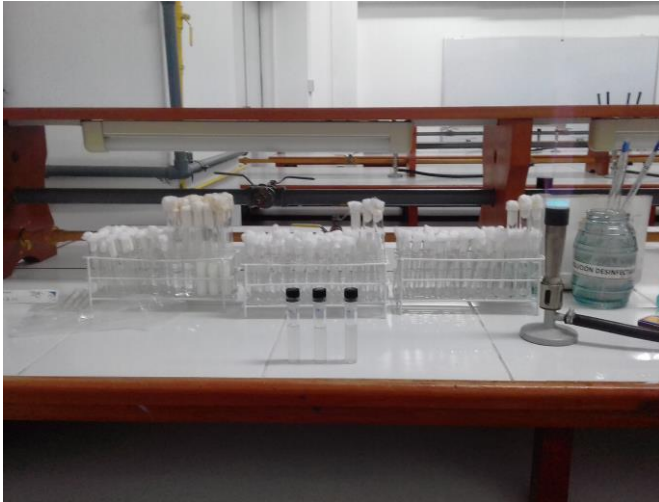


**Figura 2.** Extracción del aceite esencial de la muña.

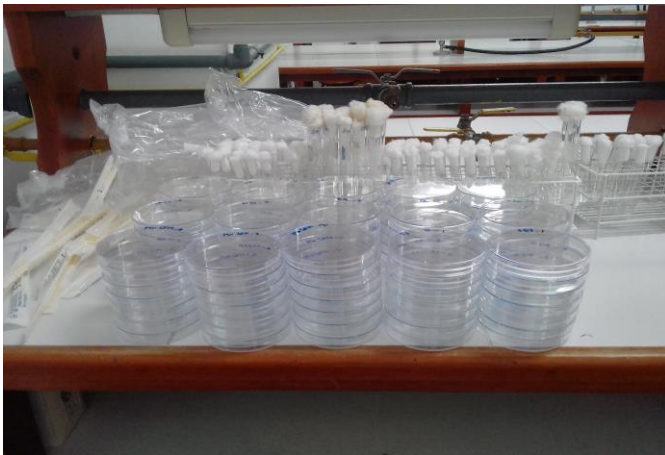


**Figura 3.** Purificación de los aceites esenciales de eucalipto y muña

**ANEXO 5. Evaluación de la efectividad antibacteriana del colutorio por el Método Reto Microbiano Modificado.**



**Figura 4.** Preparación del material de vidrio estéril para el análisis.



**Figura 5.** Preparación del material descartable estéril para el análisis.



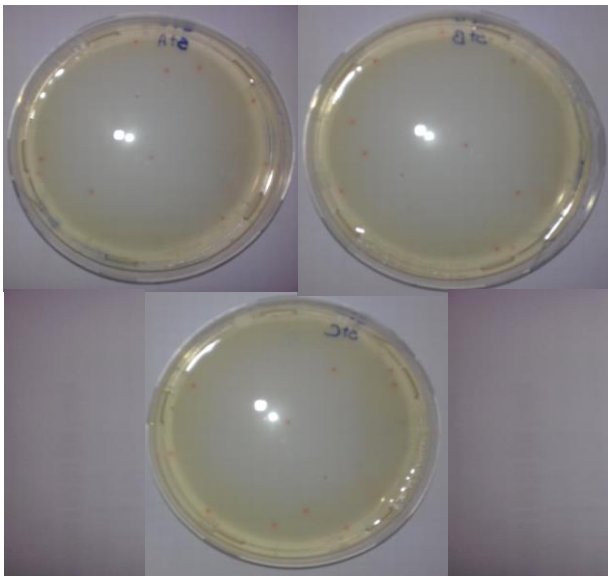
**Figura 6.** Incorporación del agar a las placas petri.



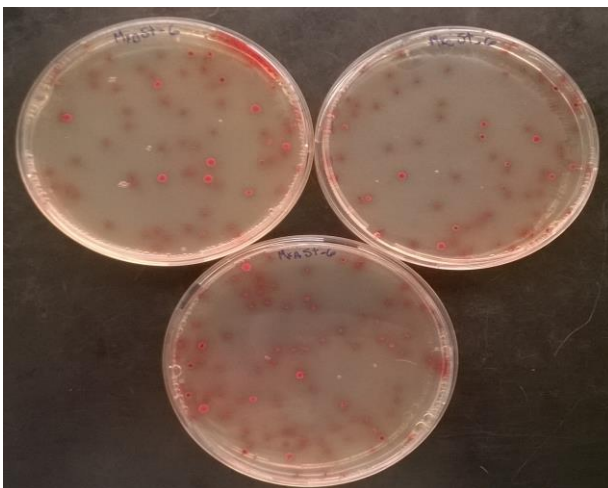
**Figura 7.** Homogenización del agar en las placas petri.



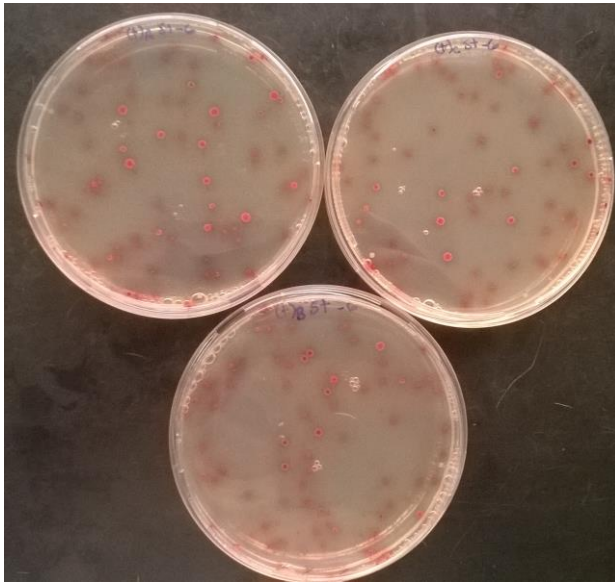
**Figura 8.** Incubación de las placas petri.



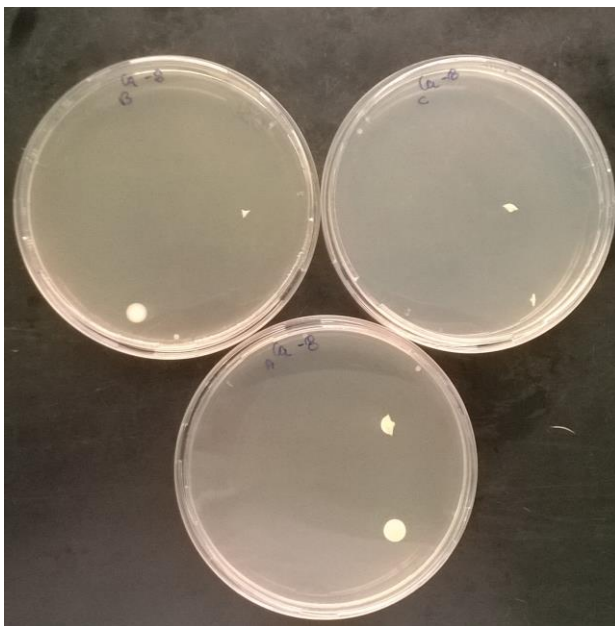
**Figura 9.** Recuento Inicial de *Staphylococcus aureus*



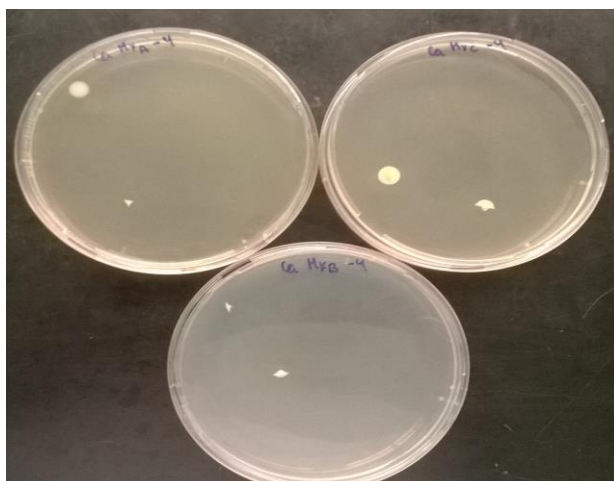
**Figura 10.** Recuento de *Staphylococcus aureus* enfrentado al colutorio de aceites esenciales.



**Figura 11.** Recuento de *Staphylococcus aureus* enfrentado al control positivo.

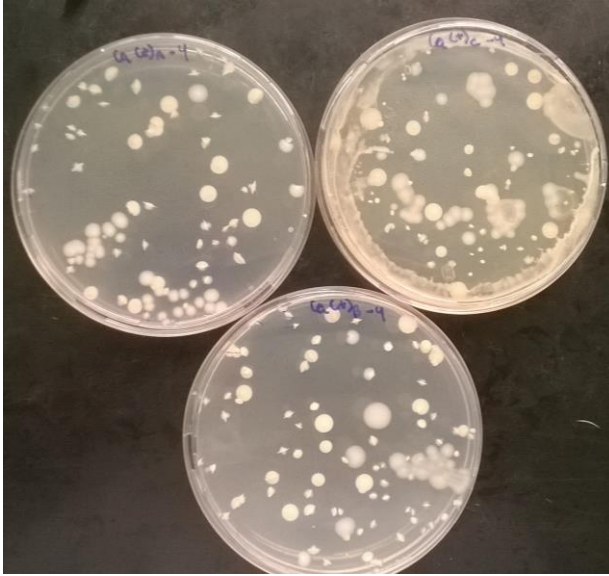


**Figura 12.** Recuento inicial de *Candida albicans*.

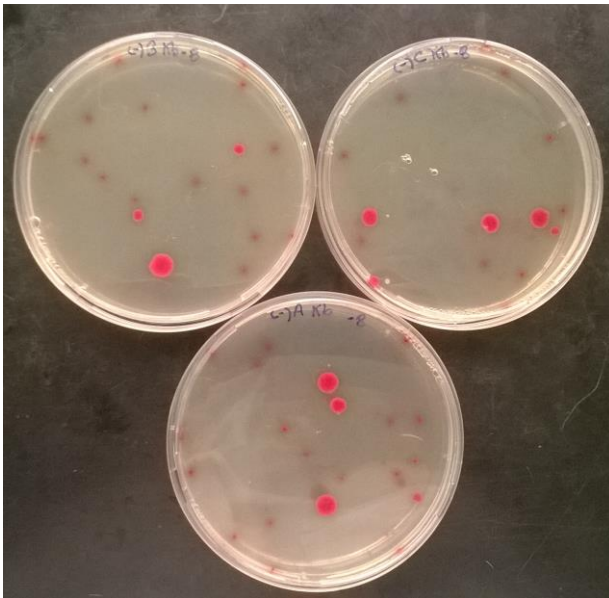


**Figura 13.** Recuento de *Candida albicans* enfrentada al colutorio de aceites esenciales.

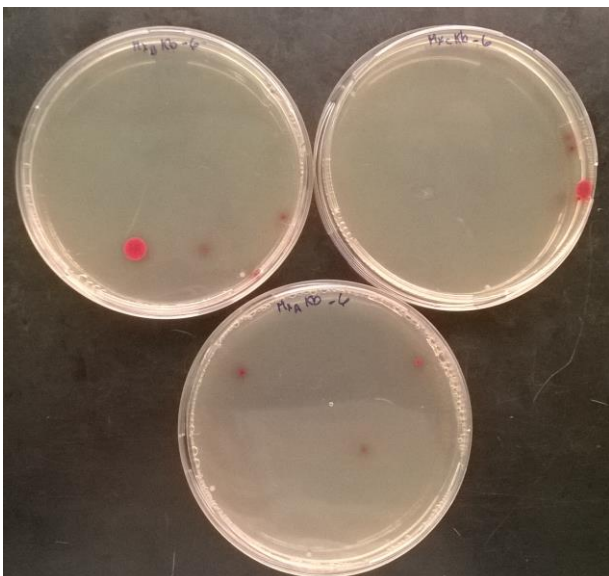




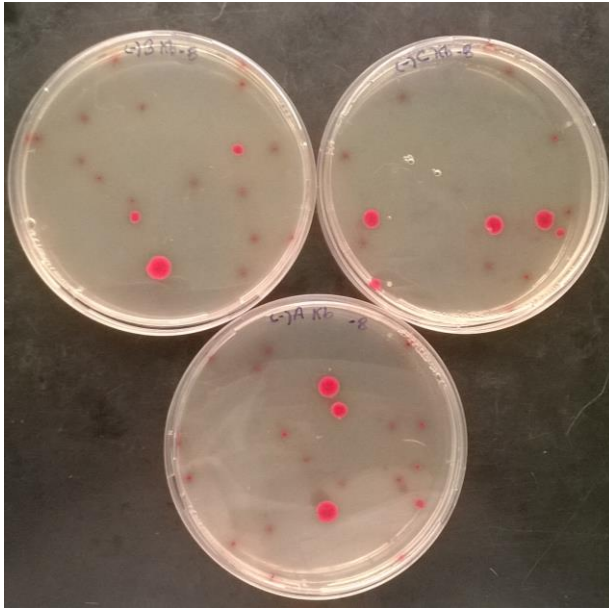
**Figura 14.** Recuento de *Candida albicans* enfrentada al control positivo.



**Figura 15.** Recuento inicial de *Klebsiella pneumoniae*.





**Figura 16.** Recuento inicial de *Klebsiella pneumoniae* enfrentada al colutorio de aceites esenciales.



**Figura 17.** Recuento inicial de *Klebsiella pneumoniae* enfrentada al control poitivo.

**ANEXO 6. Constancias de posición taxonómica de las especies vegetales utilizadas.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL**

---

*“Año del Buen Servicio al Ciudadano”*

**CONSTANCIA N° 246-USM-2017**

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

La muestra vegetal (rama estéril) recibida de **Roosevelt Edhair AYLAS CANICELA**, estudiante de la Universidad Norbert Wiener, ha sido estudiada y clasificada como ***Eucalyptus globulus*** Labill. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: MYRTALES**

**FAMILIA: MYRTACEAE**

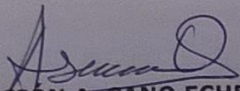
**GENERO: *Eucalyptus***


**ESPECIE: *Eucalyptus globulus* Labill.**

Nombre vulgar: “eucalipto”  
Determinado por Mag. Asunción Cano Echevarría

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

Lima, 30 de octubre de 2017

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



ACE/ddb



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

## CONSTANCIA N°247-USM-2017

EL JEFE 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 **Rossevelt Edhair AYLAS CANICELA**, estudiante de la Universidad NORBERT WIENER, ha sido estudiada y clasificada como: ***Minthostachys sp.*** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: LAMIALES**

**FAMILIA: LAMIACEAE**

**GENERO: *Minthostachys***

**ESPECIE: *Minthostachys sp.***

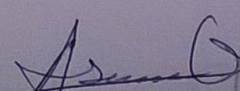
Nombre vulgar : "muña"

Determinado por: Mg. Asunción Cano Echevarría

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

NOTA: El material estéril no ha permitido lograr una clasificación taxonómica exacta.

Lima, 14 de noviembre de 2017

  
**Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/ddb