



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

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

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Lippia alba* AL 30% 50% Y 60% FRENTE
A *Streptococcus mutans* ATCC 25175. TRUJILO - 2019.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
CIRUJANO DENTISTA**

AUTOR

LOYAGA JULIAN, CYNTHIA TATIANA

ORCID ID: 0000-0002-5717-6926

ASESOR

HONORES SOLANO, TAMMY MARGARITA

ORCID ID: 0000-0003-0723-3491

TRUJILLO-PERÚ

2022

1. TÍTULO DE LA TESIS

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Lippia alba* AL 30% 50% Y 60% FRENTE
A *Streptococcus mutans* ATCC 25175. TRUJILLO - 2019.**

2. EQUIPO DE TRABAJO

AUTOR

Loyaga Julián, Cynthia Tatiana

ORCID ID: 0000-0002-5717-6926

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Estudiante de Pregrado
Trujillo, Perú

ASESOR

Honores Solano, Tammy Margarita

ORCID ID: 0000-0003-0723-3491

Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Facultad de Ciencias de
la Salud, Escuela Profesional de Odontología, Trujillo, Perú

JURADO

De La Cruz Bravo, Juver Jesús

ORCID: 0000-0002-9237918X

Loyola Echeverría, Marco Antonio

ORCID: 0000-0002-5873-132X

Ángeles García, Karen Milena

ORCID: 0000-0002-2441-6882

3. HOJA DEL JURADO Y ASESOR

Mgtr. DE LA CRUZ BRAVO, JUVER JESÚS

PRESIDENTE

Mgtr. LOYOLA ECHEVERRÍA, MARCO ANTONIO

MIEMBRO

Mgtr. ANGELES GARCÍA, KAREN MILENA

MIEMBRO

Mgtr. HONORES SOLANO, TAMMY MARGARITA

ASESOR

4. HOJA DE AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA

Agradecimiento

A Dios, por su inmenso amor y gracia que me permite alcanzar mis metas, me siento agradecida y bendecida por ello.

A mis docentes, los cuales fueron pilares de sapiencia, en mi desarrollo como estudiante, por compartir sus conocimientos, tiempo y voluntad para ayudarme a alcanzar parte de mis metas.

Dedicatoria

A mis padres y hermanos:

Por su apoyo incondicional que me permite lograr esta carrera, por sus consejos que han sido claves para superar los retos de la vida y por su motivación constante que ha sido precisos para fortalecer mis debilidades y lograr mis objetivos.

A mi hija:

Por ser la fuerza y motivación en mi vida, que me ayuda a superarme y lograr esta esta meta.

5. RESUMEN Y ABSTRACT

Resumen

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba* al 30% 50% y 60% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Metodología:** Este estudio fue de tipo cuantitativo, nivel explicativo, diseño experimental, cuya población estuvo conformada por 10 repeticiones de cada grupo de cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, los cuales fueron incubados en Caldo Brain Heart Infusión (BHI) y en Agar TSYB. Asimismo, se recolectó e identificó la planta de *Lippia alba* de la cual se extrajo su aceite en diferentes concentraciones 30, 50 y 60 %. El efecto antibacteriano se evaluó mediante el método de KIRBY BAUER. **Resultado:** El promedio de los halos de inhibición del aceite esencial al 30% obtuvo una media 11.17 mm, al 50% una media 13.91 mm, y al 60% una media 17.72 mm. Se aplicó la prueba ANOVA, encontrando $P= 0.00$, existe diferencia estadística significativa entre los tres tipos de concentraciones. **Conclusión:** El aceite esencial de *Lippia alba* al 60% presentó mayor efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* que las otras dos concentraciones.

Palabras clave: Antibacteriano, Aceites de plantas, *Lippia*, *Streptococcus mutans*.

Abstract

Objective: Determine the *in vitro* antibacterial effect of *Lippia alba* essential oil at 30%, 50% and 60% against *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Methodology:** This study was quantitative, explanatory level, experimental design, whose population consisted of 10 repetitions of each group of strains of *Streptococcus mutans* ATCC 25175, which were incubated in Brain Heart Infusion Broth (BHI) and in TSYB Agar. Likewise, the *Lippia alba* plant was collected and identified, from which its oil was extracted in different concentrations: 30, 50 and 60%. The antibacterial effect was evaluated by the KIRBY BAUER method. **Result:** The average of the inhibition halos of the essential oil at 30% obtained an average of 11.17 mm, at 50% an average of 13.91 mm, and at 60% an average of 17.72 mm. The ANOVA test was applied, finding $P= 0.00$, there is a significant statistical difference between the three types of concentrations. **Conclusion:** The essential oil of *Lippia alba* at 60% had a greater antibacterial effect against *Streptococcus mutans* than the other two concentrations.

Keywords: Antibacterial agent, *Lippia*, plant oils, *Streptococcus mutans*.

6. Contenido

1. Título de la tesis	ii
2. Equipo de trabajo	iii
3. Hoja del jurado y asesor	iv
4. Hoja de agradecimiento y dedicatoria.....	vi
5. Resumen y abstract	vii
6. Contenido	ix
7. Índice de tablas y gráficos.....	x
I. Introducción	1
II. Revisión de la literatura	4
III. Hipótesis	22
IV. Metodología	23
4.1 Diseño de la investigación.....	23
4.2 Población y muestra.....	25
4.3 Definición y operacionalización de variables.....	27
4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	28
4.5 Plan de análisis.....	31
4.6 Matriz de consistencia.....	32
4.7 Principios éticos.....	33
V. Resultados	35
5.1 Resultado.....	35
5.2 Análisis de resultados.....	38
VI. Conclusiones	41
Aspectos complementarios.....	43
Referencias bibliográficas.....	44
Anexos	51

7. ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Índice de tablas

Tabla 1.- Efecto antibacteriano, *in vitro*, entre diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Trujillo - 2019.....41

Tabla 2: Test de DUNCAN, efecto antibacteriano, *in vitro*, entre diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Trujillo – 2019.....41

Índice de gráficos

Gráfico 1.- Efecto antibacteriano, <i>in vitro</i> , entre diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. Trujillo – 2019.	42
---	----

I. INTRODUCCIÓN

Se conoce a la caries dental como una enfermedad multifactorial y muy frecuente en nuestra sociedad, a pesar del tiempo y de los nuevos estudios alcanzados aún es preocupante su alta tasa de prevalencia en nuestro país, según el último estudio nacional del estado bucal de niños de 6 a 15 años de edad, la prevalencia de caries dental a los 12 años fue de 87% con un índice de CPOD de 3,7. Los programas básicos de salud bucal (preventivo promocionales) no logran disminuir los índices epidemiológicos en enfermedades bucales.¹

El principal responsable de esta enfermedad es una bacteria llamada *Streptococcus mutans*, el cual cumple un papel muy importante y que junto a otros microorganismos participan activamente en la patogénesis de la caries dental, dentro de la cavidad oral encontramos más de 700 especies bacterianas, algunas de ellas se transforman en bacterias patogénicas, acidúricas y acidogénicas. El *Streptococcus mutans* produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos disuelven rápidamente el mineral del esmalte, permitiendo así su desmineralización.²

Debido a las altas tasas de prevalencia de caries dental, y más aún en una sociedad de bajos recursos, es imposible controlar esta enfermedad, es por ello que se busca soluciones accesibles para combatir esta enfermedad, y una de ellas es a través de los antibacterianos procedentes de las plantas naturales. En nuestro país contamos con numerosas plantas con propiedades medicinales, de las cuales desconocemos sus beneficios, entre ellas está la *Lippia alba*. Esta planta crece en ambientes donde hay alta intensidad lumínica, se distribuye desde el sur de los Estados Unidos, toda

Centro América y América del Sur hasta el norte de Argentina³. La *Lippia alba* es un arbusto aromático y medicinal comúnmente se usa como planta ornamental por poseer lindas flores y de colores muy variados, y sus hojas en infusiones. Su aceite en su forma esencial posee dos sustancias fundamentales, los terpenoides y los fenilpropanoides.⁴ Ésta tiene diversos usos comerciales y medicinales por poseer propiedades, sedativas, calmantes, antidepresivas, antibacteriano, desinflamatorio, antipirético, antidiarreico, antifúngico, actúa a nivel intestinal y hepático, tiene actividad anticolesterolemica, y otras propiedades que le hacen única y poderosa en nuestro medio.^{5,6} Las últimas investigaciones demuestran que los extractos y aceites esenciales de esta planta han demostrado ser bioactivos *in vitro* e *in vivo*.

Dado lo mencionado, se expresó el siguiente enunciado del problema: ¿Cuál es el efecto antibacteriano, *in vitro*, del aceite esencial de *Lippia alba* a diferentes concentraciones al 30, 50 y al 60% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175? De la tal manera se consideró como objetivo general comparar el efecto antibacteriano, *in vitro*, entre diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175; y como objetivos específicos evaluar el efecto antibacteriano, *in vitro*, del aceite esencial de *Lippia alba* a concentraciones de 30, 50 y 60% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Por otro lado, la justificación de esta investigación tiene como base, evaluar el poder antibacteriano de *Lippia alba*, pudiéndose elaborar a partir de ésta muchos medicamentos a futuro aplicados a la odontología en forma de geles, pastas,

colutorios y barnices para combatir a la caries dental brindando alternativas beneficiosas para nuestra sociedad a bajo costo y de fácil uso.

El aporte científico de este estudio, es ampliar el conocimiento a la ciencia, ya que hay pocos estudios que demuestren el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lippia alba*, específicamente sobre bacterias de *Streptococcus mutans*.

El presente estudio se realizó en el mes de junio en el Laboratorio Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Esta investigación buscó determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans*. Fue de tipo cuantitativo, diseño experimental, prospectivo, transversal, analítico y nivel explicativo. La población y muestra se constituyó por placas Petri cultivadas con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, y se elaboró 10 repeticiones de cada una con las concentraciones del aceite esencial respetivamente. Se recolectó y se seleccionó la planta de *Lippia alba* de lo cual se obtuvo aceites esenciales en tres concentraciones, 30, 50 y 60%. El efecto antibacteriano se determinó mediante el método de KIRBY BAUER. De tal manera que se obtuvo los siguientes resultados del aceite esencial de *Lippia alba* al 30% obtuvo una media de 11.17 mm, al 50% una media de 13.91 mm, y al 60% una media de 17.72 mm. En conclusión, el aceite esencial de *Lippia alba* al 60% presentó superior efecto antibacteriano que las demás concentraciones.

II. Revisión de la literatura

2.1 Antecedentes

INTERNACIONALES

Porfirio M.⁸ (Brasil, 2017). Realizó un estudio sobre “Actividad antibacteriana y antibiofilm *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba*, citral y carvona contra *Staphylococcus aureus*”. **Objetivo:** Evaluar la actividad antibacteriana y antibiofilm de los aceites esenciales de tres quimiotipos de *lippia. alba* y de sus compuestos principales (citral y carvona) contra *Staphylococcus aureus*.

Metodología: Se recolectaron tres tipos de *Lippia. alba*, en diferentes periodos, se trituraron y se sometieron a hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger, los aceites se transfirieron a matraces de vidrio que se mantuvieron a -5 ° C hasta su uso. Se observó un rendimiento de 0,578% p / p, 1,203% p / py 2,654% p / p para LA1EO, LA2EO y LA3EO, respectivamente. Se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y se reactivó en Agar Soya Tripticasa para análisis bacteriológicos. La formación de biopelícula se evaluó utilizando la técnica de placa de microvaloración con el ensayo de violeta de cristal 0,1%, se sometió a lectura de absorbancia, las placas se sometieron a un baño de ultrasonidos (GNATUS Digital Ultrasonic Cleaner) durante 5 minutos, que se sembraron (10 µL por triplicado) en Agar Soya Tripticasa (Difco), y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Se utilizó el análisis estadístico ANOVA seguido de la prueba de Student-Newman-Keuls con intervalo de confianza del 95%.

Resultado: Todos los aceites esenciales de *Lippia alba* presentaron potencial de inhibición (100%) de *Staphylococcus aureus* a la concentración de 0.5 mg

mL⁻¹ de LA1EO, LA2EO, citral y carvona. Además, se observó inhibición potencial en las tres concentraciones por debajo de 0,5 mg mL⁻¹ de LAEO, citral y carvona. **Conclusión:** Se demostró el efecto *in vitro* de los aceites esenciales de tres especímenes de *Lippia alba* contra el plancton y el biofilm de *Staphylococcus aureus*.

Tofiño R.⁹ (Colombia, 2016). Realizó un estudio sobre el “Efecto de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Cymbopogon citratus* sobre las biopelículas de *Streptococcus mutans* y la citotoxicidad en células CHO”. **Objetivo:** Evaluar la capacidad de erradicación de biofilms de *Streptococcus mutans* y la toxicidad en células eucariotas de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Cymbopogon citratus*. **Metodología:** El aceite esencial de *C. citratus* se extrajo de un cultivo franco muy fértil, ligeramente ácido y la planta de *L. alba* se extrajo en el laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Córdoba, de suelos franco arcillosos de fertilidad moderada, ligeramente ácidos. Los aceites esenciales se extrajeron mediante destilación al vapor y luego se determinó su composición química. Se utilizó el ensayo MBEC de alto rendimiento (MBEC-HTP) (Innovotech, Edmonton, Alberta, Canadá) para determinar la concentración de erradicación de las biopelículas de la cepa de *S. mutans* ATCC 35668. Para verificar la formación de biopelículas, se colocaron en 200 mL de solución salina al 0.9% en un limpiador sónico (MIDMARK Soniclean modelo M 150) durante 30 min. Con las suspensiones resultantes, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶ y estos se cultivaron en placas de agar BHI añadiendo sacarosa al 10%. **Resultado:** Los componentes principales de ambos aceites fueron geraniol y citral; en *L.*

alba 18,9% y 15,9%, respectivamente, y en *C. citratus* 31,3% y 26,7%. Los aceites esenciales de *L. alba* presentaron una actividad erradicadora frente a biofilms de *S. mutans* del 95,8% en concentración de 0,01 mg / dL y los aceites esenciales de *C. citratus* mostraron dicha actividad erradicadora del 95,4% en la misma concentración. **Conclusión:** Los aceites esenciales de *L. alba* y *C. citratus* mostraron actividad antibacteriana frente a biofilms de *Streptococcus mutans*.

Paulo L.¹⁰ (Brasil, 2015). Realizó un estudio sobre “Aceites esenciales y compuestos aislados de hojas y flores de *Lippia alba*: Actividad antimicrobiana y apoptosis de osteoclastos”. **Objetivo:** Investigar si los aceites esenciales de *Lippia alba* muestran *in vitro* actividad antibacteriana contra patógenos periodontales, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*; ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*; ATCC 25586) y *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*); mediante la determinación de su concentración inhibitoria mínima (CMI) y concentración bactericida mínima (MBC). **Metodología:** Se aplicó la técnica de hidrodestilación con vapor para la extracción de los aceites esenciales de las hojas y flores secas. La composición química de los aceites esenciales se determinó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC / MS). La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó según el método de macrodilución en caldo. Se prepararon soluciones de aceites esenciales (50 mg / ml), usando Tween-80 al 10% como disolvente. **Resultados:** Los valores observados para *P. gingivalis*, en el aceite esencial extraído de las hojas de *Lippia alba* fue de MIC 0,00625 mg / ml, y para *B. fragilis*

CMI 0,4 mg / ml. En cuanto al aceite esencial extraído de las flores, para *P. gingivalis* CMI 0.0125 mg / ml, para *A. actinomycetemcomitans* CMI > 3,2 mg / ml, *B. fragilis* CMI 1,6 mg / ml y para *F. nucleatum* CMI 0,8 mg / ml. **Conclusión:** Los aceites esenciales extraídos de las hojas y flores de *Lippia alba* tienen actividad antimicrobiana contra los principales microorganismos periodontales gramnegativos.

Saete F.¹¹ (Brasil, 2014). Realizó un estudio sobre “Acción de los aceites esenciales de especies medicinales autóctonas y exóticas brasileñas sobre las biopelícula orales”. **Objetivo:** Evaluar la actividad de los aceites esenciales de veinte plantas medicinales contra las células planctónicas y las biopelícula de patógenos orales, así como la composición química de los aceites más activos. **Metodología:** Los aceites esenciales se obtuvieron a partir de 100 g de partes frescas de plantas mediante destilación de agua utilizando un sistema tipo Clevenger. Se estudiaron los siguientes patógenos orales: *Candida albicans*, bacterias *Streptococcus sanguis* ATCC 10556, *Streptococcus mitis* ATCC 903, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 y *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. Cada biofilm adherido se transfirió mediante técnica de hisopo a la superficie de agar sangre o agar SDA en placas de Petri y se incubó a 30 ° C por hasta cinco días. **Resultados:** Los datos obtenidos presentaron actividad antimicrobiana de fuerte a moderada contra todos los microorganismos, *Candida albicans* CMI 0.250, *Fusobacterium nucleatum* CMI 0.125, *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus mitis*, la cual presentaron el

mismo resultado CMI 0.250. **Conclusión:** Los aceites esenciales de *Lippia alba* presenta actividad antibacteriana sobre las biopelículas orales.

Terezinha F¹² (Brasil, 2014). Realizó un estudio que demostró “Variabilidad estacional de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba*”.

Objetivo: Evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* frente a microorganismos de importancia alimentaria, relacionando los resultados observados con los meteorológicos. **Metodología:** Se recolectaron muestras de las hojas de *Lippia alba* (MILL.) NEBrown (Verbenácea), las cuales se sometieron a hidrodestilación durante 4 h, utilizando un aparato tipo Clevenger, el aceite obtenido se transfirió a botellas de vidrio color ámbar. Las especies bacterianas patógenas que se utilizaron en este estudio fueron *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria innocua* ATCC 19115, *Listeria monocytogenes* ATCC 33090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P. Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar. La actividad antimicrobiana se evaluó midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los pocillos. **Resultados:** El aceite esencial de *Lippia alba* demostró actividad antimicrobiana contra todas las especies Gram positivas. El aceite esencial obtenido de diciembre a febrero tuvo la mejor respuesta frente a la especie *S. aureus* (5,9 mg / ml). Contra *L. Monocytogenes*, de junio a agosto (11,7 mg / ml), mientras que para *L. Innocua*, obtuvo una respuesta similar en los tres períodos del año (23,4 mg / mL). **Conclusión:** El aceite esencial de las hojas

de *Lippia alba* demuestra actividad antimicrobiana contra todas las especies bacterianas analizadas y la estacionalidad de los componentes del aceite influye en esta actividad antimicrobiana.

Ramón J.¹³ (Colombia, 2007). Realizó un estudio que demostró “Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima”. **Objetivo:** Valorar la actividad antibacteriana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis*. **Metodología:** Realizó un estudio tipo experimental, el material vegetal se recolectó en el municipio de Chaparral en el departamento del Tolima. Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación de 100g de material vegetal, durante 2 h en un equipo Clevenger. Se empleó el método de difusión en agar con disco y diluciones dobles seriadas en medio líquido. Los discos se impregnaron por 5 minutos con c/u de los extractos, aceites esenciales, los distintos controles negativos (etanol 96%, acetato de etilo, agua destilada y metanol) además de los diferentes controles positivos para cada uno de los microorganismos, se incubaron las placas a 37⁰ C por 24 h y después de este periodo se midieron los halos de inhibición en cm. **Resultado:** Se procedió a evaluar las concentraciones de 50, 25 y 12,5 % en *Staphylococcus aureus* presentando un halo de inhibición de 2.3 cm, 1.7 cm, 1.7 cm respectivamente, se determinó que la actividad es dependiente de la concentración, como resultado se evidenció que los aceites esenciales de *Lippia alba* fueron activos contra todos los microorganismos ensayados, mostrando una zona de inhibición superior o similar

a la de los controles positivos, tanto para *C. albicans*, *Staphylococcus aureus*, y *E. coli*. **Conclusión:** Existe poder antimicrobiano del aceite esencial de *Lippia alba* sobre diferentes tipos de microorganismos.

NACIONALES

Reyles C.¹⁴ (Trujillo, Perú, 2019). Realizó un estudio sobre “Efecto antibacteriano del colutorio a base de aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175”. **Objetivo:** Evaluar el efecto antibacteriano del colutorio compuesto de aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) a diferentes concentraciones frente a cepas de bacterias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. **Metodología:** Se elaboró un colutorio compuesto de aceite esencial de *Lippia alba* a concentraciones de 10, 20 y 30%, y para ello empleó 400 gramos de hojas verdes, las cuales fueron sometidas a un proceso de arrastre a vapor por hidrodestilación. Para determinar el poder antibacteriano se realizó una prueba de sensibilidad antibiótica de difusión por disco Kirby Bauer, realizando 10 repeticiones por cada concentración con agar Müller Hinton y se cultivaron junto con las cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175 en condiciones de anaerobiosis por 24 horas, luego se comparó los halos de inhibición con clorhexidina al 12%. **Resultado:** Los halos de inhibición bacteriana al 10, 20, y 30 % fueron de 6.6 mm, 12.3 mm y 16.6 mm respectivamente y para el grupo control con clorhexidina al 0.12% fue 22.6 mm. **Conclusión:** El colutorio compuesto de *Lippia alba* tiene el poder antibacteriano

sobre cepas de bacterias de *Streptococcus mutans* ATCC25175 la cual aumenta a medida que aumenta su concentración.

Coronel J.¹⁵ (Chimbote, Perú, 2019). Realizó un estudio sobre el “Efecto del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) frente al crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175”. **Objetivo:** Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) frente al crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175”. **Metodología:** Se utilizó un equipo de tipo Clevenger para la obtención del aceite esencial mediante arrastre de vapor de agua. La estandarización de la cepa ATCC®25175 fue según la escala de Mc Farland 0.5, para lo cual se utilizó un inóculo de colonias de *Streptococcus mutans* en 5ml de suero fisiológico hasta obtener la misma turbidez que el patrón de Mc Farland 0.5. Se utilizaron discos de papel embebidos del aceite esencial de *Lippia alba* para inhibir el crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ se usó como control clorhexidina al 0.12% y como diluyente del aceite esencial de *Lippia alba* se utilizó dimetilsulfoxido, en diferentes concentraciones. **Resultados:** El promedio del control positivo (Clorhexidina 0.12%) fue menor 14.1 mm, que el aceite esencial de *Lippia alba* al 100%, el cual se obtuvo un halo de inhibición de 32.2 mm, el aceite esencial de *Lippia alba* al 75% tubo un halo de inhibición de 24,4mm, al 50% se obtuvo un halo de inhibición de 19.2 mm, al 25% se obtuvo un halo de inhibición de 15.4 mm y el control negativo de DMSO 25% (dimetilsulfóxido) no obtuvo halo de inhibición del crecimiento bacteriano. **Conclusión:** El aceite esencial de *Lippia alba* (Pampa orégano) al 100%

comparado con el control positivo (Clorhexidina 0.12%) presento mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa TM patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175.

Rodríguez J.¹⁶ (Trujillo, Perú, 2018). Realizó un estudio sobre el “Efecto *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Lippia frente a Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*” **Objetivo:** Determinar el efecto *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Metodología: Fue de tipo experimental, se recolectaron hojas *Lippia alba* del jardín botánico de plantas medicinales, y se utilizaron cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. se extrajo el aceite esencial mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua, para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se trabajó por triplicado mediante el método de macrodilución en caldo Brain Heart Infusion a concentraciones de 2, 2.5, 3. 3.5, 4, 4.5 uL/mL, para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Resultado: El aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Staphylococcus aureus* que en las concentraciones de 2 y 2.5 uL/MI presentó crecimiento bacteriano y a partir de 3 hasta 4,5 uL/mL se pudo apreciar recién la inhibición bacteriana. Posteriormente en la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se utilizó el método de difusión de agar en placa, obteniéndose la CMB del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Staphylococcus aureus* de 3 uL/mL. **Conclusión:** El aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* tiene efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Caries dental

La caries dental es una enfermedad muy frecuente en los seres humanos, muchos autores han tratado de describir esta enfermedad y algunos de ellos la refieren como una entidad patógena originada por microorganismos que se fijan a la superficie del esmalte dentario y también se dice que es una enfermedad multifactorial. Otros autores la describen basándose en su sintomatología como las lesiones ocasionadas, las cavidades y el dolor, otros la definen de acuerdo a sus factores etiológicos y la interacción que se produce entre ellos; como sucede en la desmineralización dental, producto de la desintegración de los carbohidratos por la presencia de bacterias.^{17, 18}

Etiología

La caries dental es una enfermedad infecciosa producida por una biopelícula bacteriana que se desarrolla en un medio bucal predominantemente patológico, la caries dental es multifactorial, ya que aparte de bacterias hay otros factores como la dieta y el huésped. La dieta, es obviamente una parte importante de la vida, y por tal motivo no podemos evitarla, sin embargo, sí podemos seleccionarla. Las características morfológicas son propias de cada individuo, sin embargo, el factor determinante en la mayoría de los casos es la saliva.¹⁹

Microflora.

Se ha demostrado que la presencia de placa dental no es requisito para el desarrollo de la caries, en muchos de los casos se debe al carácter de la infección, que es

originada por bacterias llamadas *Streptococcus* específicamente del grupo *mutans*, estos son considerados como iniciadores del proceso cariogénico.²⁰

Para entender el proceso del origen de la caries dental y su relación con las bacterias, es fundamental conocer las diferentes formas de colonización de estas bacterias y su efecto sobre la superficie dental.²¹

Colonización bacteriana

El primer paso para el desarrollo de la caries se denomina fijación inicial de los microorganismos bacterianos sobre el esmalte dentario. En este proceso intervienen unas proteínas de los microorganismos y otras de la saliva, estas interactúan de tal manera que son retenidas por el esmalte dentario. Lo cual permite la colonización de los microorganismos, previo a este proceso es necesaria la formación de la película adquirida o también llamada cutícula del esmalte.²¹

Este proceso se desarrolla por la presencia de cargas electrostáticas. Estas cargas eléctricas de las proteínas se relacionan con la existencia de conjuntos ionizables de los aminoácidos que lo constituyen.²¹

Últimas investigaciones demuestran, la vinculación de los microorganismos a la cutícula del esmalte o biopelícula no está dada únicamente por uniones electrostáticas, sino que también intervienen moléculas proteicas, que son las adhesinas, ésta se incorpora a la saliva específicamente a su proteína, ésta interviene y posibilitan la fijación de microorganismos. Esto ocurre debido a la teoría que reconoce las moléculas (reconocimiento molecular). Existe evidencia que, a mayor fuerza de fijación de los microorganismos, mayor es el predominio de caries dentaria.²¹

Elementos de virulencia.

Las causas de virulencia implicados en el proceso cariogénico son:

1.- La producción de ácidos, las bacterias del grupo *Streptococcus* son capaces de fermentar la glucosa proveniente de la dieta con el fin de producir ácido láctico, este compuesto tiene la capacidad de disminuir el pH, permitiendo así el proceso de la desmineralización.²²

2 – La facultad de sobrevivir en un ambiente con pH disminuido.²²

3. La capacidad de soportar un medio ácido mediante el bombardeo de protones fuera de la célula.²²

4. Síntesis de glucanos y fructanos, a partir del glucosil y fructosiltransferasas, se originan dos compuestos, glucano y fructano. Estos glucanos cooperan con los microorganismos para adherirse a la superficie del diente y ser utilizados a manera de depósitos de alimentos.²²

Las enzimas glucosiltransferasas activan la desintegración de dos partículas de azúcares en glúcidos: La alfa-D-glucosa y la beta-D-fructuosa. Las partículas de azúcar consecuente, son polimerizadas por enlaces alfa (1-6), alfa (1-4) o alfa (1-3) y originan los glucanos extracelulares bacterianos y luego se desprenden dos azúcares de fructuosa.²²

El *Streptococcus mutans* produce glucosiltransferasas A1, resultado de la GTF-I y la GTF-SI, y se le nombra mutano, éste se relaciona con el proceso de fijación, agregado y depósito bacteriano en la placa bacteriana.²²

Por tal motivo la habilidad de producir mutano, está relacionada con la capacidad de producir caries dental por parte de esta bacteria.

5. Elaboración de dextranasa.

Los microorganismos poseen la habilidad de reducir y librar enzimas en la mutanasa dextranasa. Ambas se sitúan en la membrana externa de las bacterias y cuando se unen con un polisacárido (glucano), lo hidrolizan y facilitan el pase de la hidrólisis hacia su parte interna.²²

Efectivamente, los glucanos son aprovechados por las bacterias para obtener energía.²²

7. Sustrato cariogénico: Entre los formadores de la caries dental, está el consumo de azúcares refinados. Muchas indagaciones confirman la relación entre caries y azúcares, estos ingeridos en la dieta crean una sustancia a partir de la microflora oral, donde comienza el desarrollo de la caries dental.²²

El azúcar, constituido por dos monosacáridos simples: la fructosa y la glucosa; tiene poder cariogénico, esto le permite producir ácido láctico y además ayuda al *Streptococcus mutans* a generar glucano, polisacárido extracelular, que se adhiere fuertemente a la superficie del diente.²²

Medios de cultivo

Se conoce como medios de cultivos a la combinación de compuestos orgánicos e inorgánicos dispersos en agua, útiles para el crecimiento bacteriano.²³

Subdivisiones

De acuerdo a consistencia:

- Sólidos: Son los que tienen una concentración 1 - 2% de agar.
- Semisólidos: Son los que tienen una concentración 0.3 – 0.7% de agar.
- Líquidos: Son los que tienen composiciones de agar.

De acuerdo a su composición química

- Sintéticos: Son derivados de combinaciones de elementos naturales y que su composición es establemente conocida.
- Semisintéticos: Son derivados de extractos o infusiones de elementos naturales y su composición química no es establemente conocida.²³

De acuerdo a su utilidad

- M. Nutritivos: Son aquellos medios simples que comprenden alimentos básicos, que habilitan el desarrollo de microorganismos heterótrofos.
- M. Enriquecidos: Son aquellos medios en los cual se agregan otros elementos, tales como sangre, suero, vitaminas, aminoácidos u otros elementos ricos en mezclas orgánicas, de origen animal o vegetal, que le abastecen de partículas nutritivas, facilitando el crecimiento de microorganismos heterótrofos exigentes.²³
- M. Selectivos: Son aquellos medios en los que se añaden algunos elementos especiales, de tal forma que reprimen el crecimiento de bacterias sin dañar a otras.²³
- M. diferenciales: Son aquellos medios a los que se le agrega ciertos elementos químicos, para permite el desarrollo y crecimiento específico de un microorganismo, consintiendo así diferenciar diferentes formas de microorganismos. De tal forma se hace viable diferenciar microorganismos hemolíticos y no hemolíticos que se desarrollan en un medio similar. El medio agar-sangre se utiliza como un ambiente de enriquecimiento y diferencial.²³

Usualmente existen diversas técnicas para alcanzar muestras típicas de diversas zonas orales y para aislar, cultivar y contar los microorganismos. Es afortunado

saber que las especies de *Streptococcus* que viven en el medio bucal pueden aislarse utilizando cultivos específicos como el Agar *Mitis salivarius* (MS). Al principio se utilizó para aislar *Streptococcus* fecales, su empleo ha sobresalido sobre otros medios de cultivo para el aislamiento de *Streptococcus* orales, implicando al *Streptococcus mutans*. En el agar MS, diversos *Streptococcus* orales revelan características de sus colonias (blanquecinas, de bordes definidos, colonias firmes muy adherentes al medio de cultivo) esto habilita su diferencia preliminar. Normalmente, la placa de agar se siembra en una atmósfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días continuos a una incubación en aire por 1 o 2 días.²³

- Clasificación de *Streptococcus*

De acuerdo a su composición y sus enlaces, se logran clasificar en varios serotipos:

- 1.-*Streptococcus*: *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k)
- 2.-*Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g)
- 3.-*Streptococcus cricetus* (serotipo a)
- 4.-*Streptococcus rattus* (serotipo b)
- 5.-*Streptococcus ferus* (serotipo c)
- 6.-*Streptococcus macacae* (serotipo c)
- 7.-*Streptococcus downei* (serotipo h)

Por interés de estudio se resalta la importancia del *Streptococcus mutans*, por ser el más destacados en la boca humana más que las cepas e, d, f y k.²⁴

Lippia alba

Género: *Lippia*

Especie: *Lippia alba*

Esta planta corresponde a la familia Verbenaceae, contiene cerca de 70 géneros y 2000 especies que se distribuyen en casi todas las regiones del planeta. Esta familia es la más numerosa de las regiones tropicales y subtropicales, éstas se aprecian como hierbas, arbustos y árboles y es de mucho valor económico por ciertos productos ornamentales y medicinales.²⁵

Nombres Tradicionales

Juanilama, Mastranto, Salvia Santa, Santa María.²⁵

Descripción Botánica

Planta aromática, 1-2 m de altura, ramas largas, cayentes, densamente pobladas. Hojas opuestas, oblongas, 2-8 cm de largo, peciolo 2-14 mm de largo, arrugadas, festonadas, cubiertas con pelillos cortos; venas prominentes en la cara externa; pedúnculos unitarios. Posee flores tubulares, 4-5 mm de longitud, pobladas, ovadas, acuminadas, las inferiores mucronadas; cabeza florales redondas u oblongas, 8-12 mm de longitud, en pares, presenta también pequeños tallos en las hojas axilares, cáliz viloso, corola, púrpura o blanca.²⁶

Hábitat y distribución

Nativa de América, crece de México a Sur América y el Caribe en laderas, a la orilla de caminos y riveras de los ríos en alturas hasta de 1800 msnm.

Obtención

Recogida de las huertas de desarrollo silvestre o a través del cultivo doméstico en los jardines familiares. Para su siembra es necesario que el suelo esté drenado, media sombra; la propagación suele hacerse por estacas de madera dura que enraízan fácilmente, acodos subterráneos o por semilla; no existen cultivos establecidos en el país. Las hojas y flores se recogen en pleno florecimiento y se secan en la sombra.²⁶

Composición química del aceite esencial

El aceite esencial de *Lippia alba* posee cualidades muy diversas, está formado por dos componentes principalmente, los terpenoides y los fenilpropanoides, aparte de ello también está integrado por siete quimiotipos más, quimiotipo I son compuestos que contienen citral, linalol, β -cariofileno. En el quimiotipo II contienen tageteoma como principal componente. Los quimiotipos III son los que contienen cantidades variables de limoneno y carvona. Los demás quimiotipos representan componentes muy definidos en su formación, como quimiotipo IV son el mirceno, V: γ -terpineno, VI: canfora -1,8-cineol y VII: estrago.²⁷

Métodos de extracción del aceite esencial de *Lippia alba*

Existen diversos procedimientos para la extracción del aceite esencial de *Lippia alba*. Por ejemplo, en los estudios realizados por Stashenko determinó la eficacia en la extracción de aceites esenciales utilizando sus hojas y tallos frescos mediante el proceso de hidrodestilación ayudada por microondas y extracción con CO₂ supercrítico. Estos investigadores corroboraron la presencia de 40 sustancias

siendo la carvona el más abundante (40–57%), después limoneno (24–37%) y biciclosesquifelandreno (5–22%). Los autores encontraron que el método de extracción afecta el rendimiento y la composición química del aceite obtenido, ya que la irradiación de microondas permitió la extracción rápida sin producir cambios en la composición del aceite esencial. Hay muchos métodos, pero el método más común para conseguir el aceite esencial de *Lippia alba* es por hidrodestilación con aparato tipo Clevenger. Se debe tener en cuenta que para alcanzar aceites esenciales con pocos cambios químicos se debe hacer la extracción en las mismas condiciones, desde el material biológico e inspeccionando la composición final del aceite esencial.²⁸

III. HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Lippia alba* al 60% presentará mayor efecto antibacteriano que las otras dos concentraciones frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Hipótesis Nula: El aceite esencial de *Lippia alba* al 60% no presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Hipótesis Alternativa: El aceite esencial de *Lippia alba* al 60% sí presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de la investigación

Tipo de investigación

De acuerdo al enfoque: Cuantitativa

Según Roberto, en su libro sobre los tipos de investigación, piensa que un estudio es cuantitativo debido a que los datos fueron producto de mediciones que se representan mediante números (cantidades) y se analiza a través de métodos estadísticos.²⁹

De acuerdo a la intervención: Experimental

Según Roberto, en su libro sobre los tipos de investigación, considera que un estudio es experimental, cuando el investigador ha intervenido en el estudio, modificando las variables para alcanzar un resultado.²⁹

De acuerdo a la planificación: Prospectivo

Según Roberto, en su libro sobre los tipos de investigación, considera que un estudio es prospectivo, porque presenta una visión a futuro y se puede anticipar los hechos.²⁹

De acuerdo al número de ocasiones: Transversal

Según Roberto, en su libro sobre los tipos de investigación, considera que un estudio es transversal, porque se estudia a la población y la relación entre variables en momento determinado del tiempo.²⁹

De acuerdo al número de variables a estudiar: Analítico

Según Roberto, en su libro sobre los tipos de investigación, considera que un estudio analítico, porque pretenden establecer una relación causal entre las variables.²⁹

Nivel de la investigación: Explicativo

Según Roberto, en su libro sobre los tipos de investigación, considera que un estudio es explicativo, porque no se limita solo a observar sino también a explicar las causas del fenómeno entre las variables.²⁹

Diseño de la investigación: Experimental

Según Roberto un estudio es experimental debido a que el investigador ha manejado la variable independiente y su resultado sobre la variable dependiente.²⁹

4.2. Población y muestra

Población

La población estuvo conformada por las placas Petri sembradas con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Placas Petri sembradas con Cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 27175.

Criterios de exclusión

- Placas Petri con halos de inhibición no muy claros.
- Placas Petri con signos de contaminación.

Muestra

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = 2 \left(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 (DE)^2 / d^2$$

Dónde:

n: tamaño de muestra para el grupo de estudio.

α : probabilidad de cometer error tipo I.

β : probabilidad de cometer error tipo II.

Z: valor estándar de la distribución normal asociada a un tipo de error.

DE: desviación estándar.

d: diferencia entre promedios para rechazar igualdad de medias.

Requerimientos:

De una confianza al 95% ($\alpha=0.05$, $Z=1.96$), y una potencia en la prueba del 80% ($\beta=0.20$, $Z=0.84$), para ($DE/d=0.80$).

$$n = 2(1.96 + 0.84)^2(0.8)^2$$

$$n = 10$$

Por lo tanto, la muestra estuvo conformada por 10 repeticiones en cada una de las concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba*.

4.3. Definición y operacionalización de variables e indicadores

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	VALORES FINALES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
VARIABLE INDEPENDIENTE: Aceite Esencial de <i>Lippia alba</i>	Sustancia concentrada que se extrae de una planta a través de diferentes métodos, conservando sus propiedades. ²⁸	Sustancia que se obtuvo por protocolos establecidos a diferentes concentraciones, partir de las hojas de <i>Lippia alba</i> .	Concentración	30% 50% 60%	Cuantitativo	De razón
VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto Antibacteriano Sobre <i>Streptococcus Mutans</i> ATCC 25175.	Efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa bacteriana, de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. ¹⁵	Es la acción antibacteriana que provocó el aceite esencial de <i>Lippia alba</i> , la cual se determinó mediante la lectura los halos de inhibición sobre las cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.	Halo de inhibición	Mm	Cuantitativo	De razón

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnica: En este estudio se aplicó la técnica de observación microbiológica

Instrumento: Se utilizó como instrumento de medida el VERNIER DIGITAL marca MITUTOYO, Modelo 500-196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper 0-150mm / 0-6", por estar calibrado y validado con ISO de calidad 17025.

Procedimientos:

1.- Obtención del aceite esencial de *Lippia alba*.

2.- Identificación Taxonómica

La especie de *Lippia alba* "pampa oregano" se recolectó del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo, del distrito de Trujillo, provincia de Trujillo, región La Libertad. Luego la especie se identificó en el Herbarium Truxillense.

3.- Extracción del aceite esencial

La extracción del aceite esencial, se realizó por el método de hidrodestilación.^{30,31}

Se seleccionaron las hojas que estaban en buenas condiciones y se desecharon aquellas que tuvieran ataques de hongos y estén decoloradas o maltratadas.

Luego las hojas de *Lippia alba* fueron lavadas con agua de caño y en seguida se desinfectó con hipoclorito de sodio al 0.5%. Posteriormente se realizó un enjuague de la planta con agua destilada estéril, esto es para retirar los residuos de hipoclorito.³²

Luego se armó el equipo de destilación, sometiendo las muestras a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, arrastrando la esencia que posteriormente por acción del refrigerante, se condensó. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, para lo cual se utilizó una pera de separación de vidrio, deshidratando

las impurezas de agua en el aceite esencial con Na₂SO₄ anhidro. Finalmente se filtró, y se guardaron los aceites en frascos de vidrio color ámbar (para evitar la descomposición por la luz) y bajo refrigeración a una temperatura entre 4 °C a 8 °C, hasta la realización del análisis microbiológico.³²

4.- Preparación de las diferentes concentraciones de los aceites esenciales

Se prepararon las concentraciones según la siguiente tabla:

Volumen de aceite	Volumen de Tween 80	Volumen final	Concentración (%)
3,0 mL	7,0 mL	5 mL	30
5,0 mL	6,0 mL	5 mL	50
6,0 mL	5,0 mL	5 mL	60

Luego, se colocó cada una de las concentraciones en frascos de vidrio de color ámbar estéril, para protegerlas de la luz, y llevándolas posteriormente a refrigeración a 4 °C, hasta la realización del análisis microbiológico.³²

5.- Reactivación y obtención del cultivo puro de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175.

La reactivación de la cepa liofilizada de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se realizó sembrando en un balón de 50 mL conteniendo 25 mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI), luego se procedió a incubar a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia.³²

Para obtener el cultivo puro, se sembró por estría en Agar Trypticasa soya (TSA) e incubó a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se eligió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar

coloración gram y se sembró en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), los cuales se conservaron en refrigeración hasta su posterior empleo.³²

6.- Preparación de las tres concentraciones del aceite esencial de *Lipia alba*.

A partir del aceite obtenido se prepararon las concentraciones de 30%, 50% y 60% respectivamente.³²

7.- Evaluación del efecto antibacteriano mediante el método de Kirby Bauer.

Para evaluar el efecto antibacteriano, de las concentraciones de 30, 50 y 60% del aceite esencial de *L. alba* frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar.³³

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

a. Preparación y estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175.

El cultivo *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mantenido en refrigeración se sembró en Agar TSA, se incubó bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 24 horas. Luego de 24 horas 3 a 4 colonias se diluyó en caldo BHI o solución salina fisiológica estéril hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 ufc/mL).³³

b.- Inoculación de las placas

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5×10^8 ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocó en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton distribuidas concentración, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se sembró en superficie, procurando una distribución uniforme

del inóculo en la placa. Se secó cada placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.³³

c.- Preparación de los discos con el aceite esencial de *L. alba*

Se prepararon discos de papel filtro whatman número 3 de 6 mm de diámetro, estéril y se les colocó 30 uL del aceite esencial a concentraciones de 30%, 50% y 60% respectivamente.³³

Luego, con una pinza estéril, se colocó los discos sobre las placas de Petri con Müeller Hinton sembradas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Se empleó como control positivo Gluconato de clorhexidina al 0.12% y como control negativo etanol 70%.

d.- Incubación:

Se incubaron las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, a 37°C durante 24 y 48 horas en microanaerobiosis (5-10% de CO₂).³³

c.- Lectura de los resultados

Después del tiempo de incubación 24 a 48 horas se examinó cada placa teniendo en cuenta el halo de inhibición del crecimiento bacteriano, seguido se midió los diámetros (mm) de los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco para lo cual se utilizó un vernier, abarcando todo el diámetro del halo.³³

Se realizó 10 repeticiones de cada ensayo.

4.5. Plan de análisis

Para el análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SPSS v. 22, y Microsoft Excel, considerando el procedimiento que a continuación se indica:

Para la presente investigación, en el análisis de los datos se aplicó la estadística descriptiva e inferencial.

De la estadística descriptiva se utilizó para presentar medidas estadísticas como la media, desviación estándar.

De la estadística inferencial se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), (datos normales) con su respectivo nivel de significancia 0.05 y para la comparación múltiples se utilizó el test de Duncan, para dar respuestas según cada objetivo.

4.6. Matriz de consistencia

TÍTULO	ENUNCIADO DEL PROBLEMA	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES	HIPÓTESIS	METODOLOGÍA
<p>EFFECTO ANTIBACTERIA NO <i>in vitro</i> DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Lippia alba</i> AL 30% 50% Y 60% FRENTE A <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. TRUJILLO 2019.</p>	<p>¿Cuál es efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> en diversas concentraciones frente a <i>streptococcus mutans</i> ATCC 25175?</p>	<p>a) Objetivo General: Comparar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, entre diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>b) objetivo Específicos: 1.- Evaluar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> a concentración de 30 % frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. 2.- Evaluar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> a concentración de 50 % frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. 3.- Evaluar el efecto antibacteriano, <i>in vitro</i>, del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> a concentración de 60 % frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>	<p>-Efecto antibacteriano -Aceite esencial de <i>Lippia alba</i>.</p>	<p>Hipótesis de la investigación: El aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 60% presentará mayor efecto antibacteriano que las otras dos concentraciones frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>H₀: El aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 60% no presenta efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>H₁: El aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 60% sí presenta efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>	<p>Tipo: Cuantitativo Nivel: Explicativo Diseño: Experimental. Población y Muestra Población: Cepa <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. Muestra: 10 placas Petri sembrada con 100 µl de suspensión bacteriana de Cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>

4.7. Principios éticos

Este estudio de investigación se fundamentó en el código de ética de la Universidad Católica Los Ángeles De Chimbote.³⁴

- **Cuidado del Medio Ambiente.** Se respetó el principio de cuidado del medio ambiente y la biodiversidad, se informa que no se registraron daños, riesgos y beneficios potenciales que afectaron a las plantas, medio ambiente o a la biodiversidad.³⁴

- **Beneficencia y no maleficencia.** Asegura el bienestar de las personas que participan en las investigaciones. La conducta del investigador responde a las siguientes reglas generales: no causar daño, disminuir los posibles efectos adversos y maximizar los beneficios.³⁴

- **Justicia.** El investigador ejerce un juicio razonable, ponderable y tomar las precauciones necesarias para asegurarse de que sus sesgos. Se reconoce que la equidad y la justicia otorgan a todas las personas que participan en la investigación derecho a acceder a sus resultados.³⁴

- **Integridad científica.** La integridad del investigador resulta especialmente relevante cuando, en función de las normas deontológicas de su profesión, se evalúan y declaran daños, riesgos y beneficios potenciales que puedan afectar a quienes participan en una investigación.³⁴

Con respecto al material biológico del estudio las placas Petri con cultivos utilizados fueron expuestas a 121° C Y 1 Bar de presión fueron inactivadas en autoclave a fin de desechar el material biológico contaminado aplicando las normas de manejo de desechos hospitalarios.³⁵

Los residuos microbiológicos y patológicos fueron eliminados de forma tal que se asegure su descontaminación en autoclave entre ellos se considera a (Residuos microbiológicos) o incineración (residuos patológicos). Esto significa una bolsa primaria de color negro, se llenó solo hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad y anudada y sobre ésta una bolsa color amarillo con logo y pre impreso de residuos especiales, se marcar el tipo de residuos que contuvo, el laboratorio o área de generación y la fecha. Estas bolsas cerradas anudadas, fueron almacenadas temporalmente en las áreas sucias en contenedores de color amarillo con logo de Residuo Biológico.³⁵

V. RESULTADOS

5.1. Resultado

Tabla N°1.- Efecto antibacteriano, *in vitro*, entre diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
Trujillo - 2019.

Tratamientos	N	Diámetro (mm)		F	Sig. (p)*
		Media	Desviación típica		
Aceite 30%	10	11.17	1.10	215.18	0.000
Aceite 50%	10	13.91	1.01		
Aceite 60%	10	17.72	2.64		
Control Negativo (etanol 70%)	10	0	0		
Control positivo (Clorhexidina 0.12%)	10	16.79	1.63		

Fuente: Datos propios obtenidos de medición.

p*: prueba ANOVA, nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

Interpretación:

De la tabla N° 01, aplicado la prueba paramétrica ANOVA, se obtuvo $p = 0.000 < 0.05$, de lo cual podemos indicar que sí existe una diferencia estadística entre los tratamientos. Se observa que el aceite esencial de *Lippia alba* al 30% obtuvo un promedio de 11.17 mm, al 50% un promedio de 13.91mm y al 60% un promedio de 17.72 mm.

Tabla N° 02.- Test de Duncan, efecto antibacteriano, *in vitro*, entre diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Trujillo - 2019.

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa =0.05 - (Test Duncan)			
		1	2	3	4
Control Negativo (etanol 70%)	10	0.00			
Aceite 30%	10		11.17		
Aceite 50%	10			13.91	
Control positivo (Clorhexidina 0.12%)	10				16.79
Aceite 60%	10				17.72
Sig.		1.00	1.00	1.00	0.183

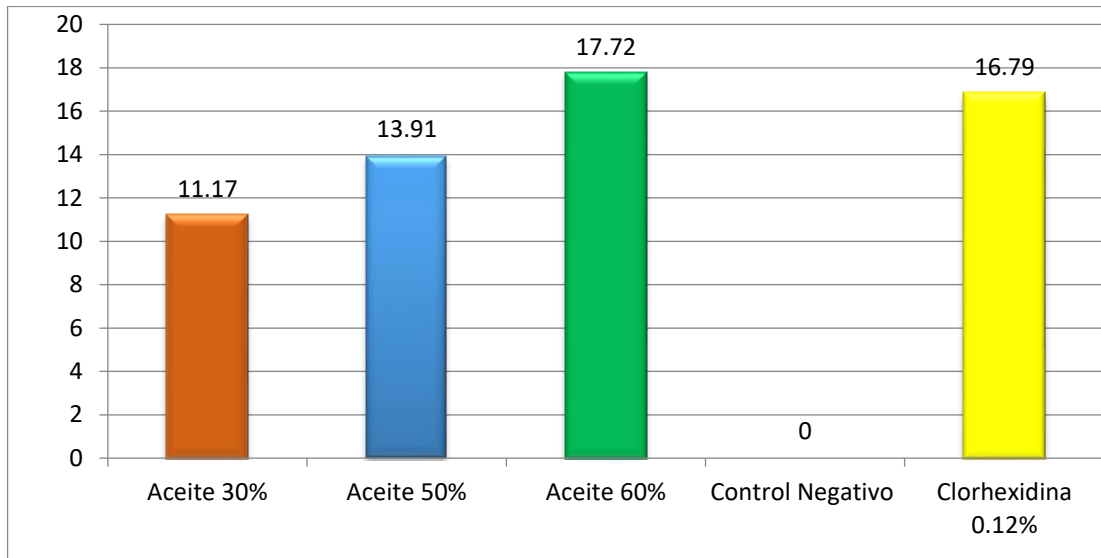
Test Duncan

Interpretación:

En la tabla N°02, se observa que el diámetro es similar en los tratamientos del aceite 60% y control positivo (Clorhexidina 0.12%.)

Así mismo los tratamientos aceite 30% y aceite 50%, no presentan similitud con ningún tratamiento.

Gráfico N° 01.- Efecto antibacteriano *in vitro* entre diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Trujillo - 2019.



Fuente: Datos obtenidos de la tabla N° 01

Interpretación:

Se observa la diferencia entre las concentraciones, el aceite esencial de *Lippia alba* al 30% obtuvo un promedio de 11.17 mm, al 50% un promedio de 13.91 mm y al 60% un promedio de 17.72 mm.

5.2 Análisis de los resultados

El presente trabajo de investigación, buscó comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia alba*, en un estudio *in vitro* en diferentes concentraciones, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, para medir el efecto antibacteriano se tomó como referencia la escala de Duraffourd³⁶ en un rango de 9 a 14 mm. (Sensibilidad bacteriana). Teniendo en cuenta los resultados, se demostró que el aceite esencial de *Lippia alba*, presentó efecto antibacteriano frente a *S. mutans* ATCC 25175, con un halo inhibición mayor a 11.17 mm. Se sabe que el aceite esencial de *Lippia allba* contiene quimiotipos, entre ellos está la presencia de citral, este componente aislado presentó los mejores resultados. El citral, un monoterpeno (3,7-dimetil-2,6-octadieno), es una combinación de dos isómeros nerales y geraniales y tiene una fuerte actividad antimicrobiana.⁸

Al evaluar la actividad antibacteriana del aceite de *Lippia alba* al 60% frente a *S. mutans* ATCC 25175, presentó un halo de inhibición de 17.72 mm, este resultado fue el mayor de todas las muestras estudiadas, incluso mayor a la muestra del control positivo, clorhexidina 0.12%, la cual presentó un halo de inhibición de 16.79 mm, estos datos indica que, a mayor concentración de aceite, mayor es el efecto antibacteriano. Datos que coinciden con varios estudios internacionales y nacionales, tales como Coronel J.¹⁵, que, en su estudio, el aceite esencial de *Lippia alba* al 75% tuvo un halo de inhibición de 24,4mm. Datos similares presentó también, Tofiño R.⁹, quien demostró su actividad antibacteriana frente a biofilms de *Streptococcus mutans*. Por otro lado, resultados similares obtuvo Rodríguez J.¹⁶ quien basado en CMB del aceite esencial de *Lippia alba*, demostró efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*. Así mismo, Paulo L.¹⁰, estudió la

respuesta antibacteriana frente a otras bacterias relacionadas con el biofilm de la cavidad oral, tales como *P. gingivalis* (MIC 0,00625 mg / ml), *A. actinomycetemcomitans* (MIC > 3,2 mg / ml), y *F. nucleatum* (CMI 0,8 mg / ml). De la misma manera Salete F.¹¹, quien realizó un estudio sobre acción de los aceites esenciales de especies medicinales autóctonas y exóticas brasileñas sobre las biopelículas orales, basados en la CMI, demostrando eficacia en todas las bacterias estudiadas. Por tal motivo se demuestra que existe también actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba* contra patógenos periodontales.

Con respecto a la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia alba* al 50% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, presentó un halo inhibición promedio de 13.91 mm. Estos resultados difieren con los resultados encontrados por Coronel J¹⁵, quien obtuvo un halo promedio de 19.2 mm, esta discrepancia se puede dar por la diferente zona donde se extrajo el aceite. Estudios similares presentados por Ramón J.¹⁴, quien evaluó el efecto antibacteriano del aceite de *Lippia alba* en diferentes pisos térmicos sobre un grupo de bacterias entre ellas el *Staphylococcus aureus*, en la misma concentración de aceite, lo cual presentó un halo de inhibición de 23 mm. De igual manera Terezinha.¹², quien evaluó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* frente a microorganismos de importancia alimentaria, relacionando los resultados observados con los meteorológicos, quien obtuvo respuesta frente a *S. aureus* (5,9 mg / ml). Por tal motivo se demuestra que el aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* muestra actividad antimicrobiana y la estacionalidad de los componentes del aceite también influye en esta actividad antimicrobiana, resultados similares presenta también Rodríguez J.¹⁶ y Salete F.¹¹

En cuanto a la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Lippia alba* al 30% frente a *S. mutans* ATCC 25175, presentó un halo de inhibición de 11.17 mm, siendo este valor el menor de todas las concentraciones estudiadas. Estudio similar presentado por Reyles C.¹⁴, quien estudió el efecto antibacteriano del colutorio a base de aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC25175” en varias concentraciones, donde al 30% el aceite esencial mostró una media de 16.6 mm, este resultado indica que su respuesta antibacteriana fue mucho mayor al resultado obtenido en nuestro estudio, esto podría deberse a la variabilidad estacional, ya que la composición química y el contenido del aceite esencial de la planta, sufren cambios durante las estaciones del año, debido que la temperatura y la luminosidad juegan un papel importante en la fotosíntesis, éstos influyen en el proceso fisiológico vegetativo y por ende alteran el contenido y la composición del aceite esencial.¹² Por otro lado, estudios casi similares realizados por Porfirio M.⁸ y Coronel J.¹⁵, quien estudio el efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, al 25%, obtuvo un halo de inhibición de 15.4 mm, este resultado destaca el poder inhibitorio sobre *Streptococcus mutans*, ya que al poseer menor concentración el aceite obtuvo mayor respuesta antibacteriana, esto podría deberse a la composición del aceite, ya que muchos de su quimiotipos, entre ellos la carvona, que posee una excelente estructura antibacteriana, que le permite desestabilizar fosfolípidos, interviene en la interrelación con las proteínas de la membrana, e interactuar con protones disminuyendo así el gradiente de pH a través de la membrana.⁸

IV. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de *Lippia alba* al 60% presentó mayor efecto antibacteriano que las otras dos concentraciones frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
2. El aceite esencial de *Lippia alba* al 30% presentó efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
3. El aceite esencial de *Lippia alba* al 50% presentó efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
4. El aceite esencial de *Lippia alba* al 60% presentó efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

ASPECTO COMPLEMENTARIO

- Se considere como una línea de investigación, en la carrera de odontología, a los estudios sobre plantas naturales, demostrando su efecto antibacteriano sobre diferentes microorganismos periodontales, y que éstas sean en mínimas concentraciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Perú. Ministerio De Salud. Oficina General De Epidemiología. Prevalencia Nacional De Caries Dental, Fluorosis Del Esmalte Y Urgencia De Tratamiento En Escolares De 6 A 8, 10, 12 Y 15 Años, Perú. 2001-2002. Lima (Perú): Ministerio De Salud; 2005. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/publicaciones/pub_caries/prevalencia_caries.pdf
- 2.- Ojeda JC, Oviedo E, Salas LA. *Streptococcus Mutans* Y Caries Dental. Rev. CES Odont. 2013; 26(1) 44-56. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
- 3.- Sandra HR, Julián MM, Natalia P G, Juan ML. Actividad Bactericida De Extractos Acuosa de *Lippia Alba* (Mill.) N.E. Brown Contra *Helicobacter pylori*. Rev Col Gastroentero. 2011; 26 (2):82-87. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=337731602002>
- 4.- Linde G, Colauto N, Albertó E, Gazim Z. Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia Alba*. Rev. Bras-Pl. Med. 2016; 18 (1): P.191-200. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/55053>
5. Medeiros J. *Lippia alba* [Internet]. Brasil: Jardín Botánico de Brasilia; 13 de agosto de 2011. [Citado 7 de septiembre de 2019]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Lippia_alba.jpg.

- 6.- Cicció. J, Ocampo R. Variación anual de la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) cultivada en Costa Rica. Rev Lankes Teriana. 2006; 6(3):149-154. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/443/44339812008.pdf>
- 7.- Ramon V, Pastrana, Felipe P, Fernández K, Viña A. Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuosos de *justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. Scientia Et Technica [Internet]. 2007. [Citado 6 de noviembre 2019]. Vol XIII (33):345-348. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903399>
- 8.- Porfírio EM, Melo HM, Pereira AM, Cavalcante TT, Gomez GA, Carvalho MG, et al. Actividad antibacteriana y antibiofilm *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba*, citral y carvona contra *Staphylococcus aureus*. Rev. Scientific World Journal. [Internet].2017. [Citado 2020 Oct 18]; Volumen 2017. DOI: 10.1155/2017/4962707. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2017/4962707>
- 9.- Rivera T, Cuadros O, Pareja G, Ríos J, Merini M, Pabón M. Efecto de los aceites esenciales de *Lippia alba* y *Cymbopogon citratus* sobre las biopelículas de *Streptococcus mutans* y la citotoxicidad en células CHO. Rev. Journal of Ethnopharmacology 194. [Internet]. 17 octubre 2016. [Citado 2020 Oct 18]; (2016) .749–754. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.044>
- 10.- Paulo PJ, Lucchese AM, Gambari G, Piva R, Penolazzi L, Ciano M, Trovatti AP, Silva F, Avila MJ. Aceites esenciales y compuestos aislados de *Lippia alba* hojas y flores: actividad antimicrobiana y apoptosis de osteoclastos. Rev.

Internacional De Medicina Molecular. [Internet]. 2015 Jan; 35(1):211-7. DOI: 10.3892. Disponible en:

https://www.ppgbiotec.com.br/portugues/arquivos/corpo%20discente/doutorado/2010/paulo_jose_lima_juiz-tese.pdf

- 11.- Bersan SM, Galvão LC, Va VF, Sartoratto A, Figueira GM, Rehder VL, et al. Acción de los aceites esenciales de especies medicinales nativas y exóticas brasileñas sobre las biopelículas orales. Rev. BMC medicina complementaria y alternativa. 2014; 14 (451). [Consultado el 18 de octubre de 2020]; DOI: 10.1186/1472-6882-14-451. Disponible en:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2008000300018&lng.

- 12.- Machado TF, Alves R C, Vasconcelos VC. Variabilidad estacional de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia alba*. Rev. Ciencia Agronómica. 2014 de sept; 45 (3), 515-519. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000300011>

- 13.- Ramon V, Felipe P, Fernández K, Viña A. Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuosos de *justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. Scientia Et Technica [Internet]. 2007. [Citado 6 de noviembre 2019]. Vol XIII (33):345-348. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84903399>

- 14.- Coronel R. Efecto Antibacteriano del colutorio a base de aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. [Tesis para optar Título Profesional]. Trujillo-Perú: Universidad católica los Ángeles de Chimbote; 2019. 71 p. Disponible en:
http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/20.500.13032/19075/AGENTE_ANTIBACTERIANO_CORONEL_ALVA_REYLES.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- 15.- Coronel AJ, Zevallos EL. efecto del aceite esencial de *Lippia alba* (Pampa Orégano) frente al crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Rev. Cientifi-K. [Internet].2019; Vol 7(2). [Citado 2020 Oct 18];7(2). DOI: <https://doi.org/10.18050/cientifi-k.v7i2.2139>.
- 16.- Rodríguez LJ, Segura AA. Efecto *in vitro* de las hojas de *Lippia alba* “pampa orégano” frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis doctoral]. Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo; 2018. 57 P. Disponible en:
<https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9704>.
- 17.- Núñez DP, García BL. Biochemistry of dental caries. Rev haban cienc méd [Internet]. 2010 [citado 2018 Oct 23]; 9(2): 156-166. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729519X2010000200004&lng=es.
- 18.- Pontigo LA, Atitlán GA. Caries Dental. [Internet]. México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: Primera edición.; 2012 [Citado el día 24

de junio del 2018]. 167 p. Disponible en:

<https://www.researchgate.net/profile/Juan-Loyola->

- 19.- Balda ZR, Solórzano PA, González BO. Tratamiento de la enfermedad de Caries dirigido al agente casual: Uso de Fluoruros. Acta odontol. Venez [Internet]. 1999 [citado 2022 Oct 10]; 37(3): 72-76. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63651999000300016&lng=es.
- 20.- Laura BC. Microbiología clínica [Internet]. España: Editorial Síntesis S.A; 2016. [Consultado el 21 de agosto 2018]. Pg 37-43. Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>
- 21.- Cuadrado VD, Gómez JF. Cariología: El manejo contemporáneo de la caries dental. [Internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México. [citado el 17 de junio del 2018]. 97p. Disponible en : [file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/PAPIMEPE209312Cariologacaptulos1y2%20\(6\).pdf.25](file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/PAPIMEPE209312Cariologacaptulos1y2%20(6).pdf.25)
- 22.- Estrada D, Riverón J, Pérez J, Fuentes H. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. Rev. cubana Estomatol [Internet]. 2006 [citado 22 Sep 2022]; 43 (1): [aprox. 8 p.]. Disponible en: <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2475>.
- 23.- Laura B. Microbiología clínica. Editorial síntesis. España. (2). pag-37-48. Disponible en: <https://www.sintesis.com/data/indices/9788490773185.pdf>.
- 24.- Ojeda-Garcés J C, Oviedo-García E, Salas Luis A. *Streptococcus mutans* y caries dental. CES odontol. [Internet]. Enero de 2013 [consultado el 22 de

septiembre de 2022]; 26(1): 44-56. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en.

- 25.- Linde G, Colauto N, Albertó E, Gazim Z. Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia Alba*. Rev. Bras-Pl. Med. 2016; 18 (1): P.191-200. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/55053>
- 26.- Morataya M. Caracterización Farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), Orégano (*Lippia graveolens*), Salvia sija (*Lippia alba*) y Salviyá (*Lippia chiapasensis*). [Tesis doctoral]. Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala; 2006. Disponible en: <https://biblioteca.farmacia.usac.edu.gt/library/index.php?title=1367&query=@title=Special:GSMSearchPage@process=@field1=autores@value1=CRUZ,%20S.%20@mode=advanced&recnum=20>.
- 27.- Oliveira D, Leitão G, Santos S, Bizzo H, Lopes D, Alviano C, Alviano D, Leitão S. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná. Rev. Journal of Ethnopharmacology. 2006; 108 (1): 103-108. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874106002236#preview-section-references>.
- 28.- González Villa A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas [Tesis de Pregrado]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales Facultad de Ingeniería y Arquitectura; 2004. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2800>

- 29.- Hernández R. Metodología de la Investigación. Quinta edición. México: Interamericana; 2010.
- 30.- Ramón J, Pastrana P, Fernandez K, Viña. Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. Rv.Scientia et Technica. 2007; Vol 1(33): pág 345-348. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4815050>
- 31.- González VA. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. [Internet]. 2004 [citado: 2019, septiembre] Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales Facultad de Ingeniería y Arquitectura Departamento de Ingeniería Química Ingeniería Química. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2800>
- 32.- Centurión VK. Efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. [Tesis doctoral]. Trujillo-Perú: Facultad de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego; 2015. 49 p. Disponible en: [https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/972/1/REP_MAESTR_ESTO_KARINA.CENTURI%
c3%93N_EFECTO.ANTIBACTERIANO.I_N.VITRO.DIFERENTES.CONCENTRACIONES.EXTRACTO.ETAN%
c3](https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/972/1/REP_MAESTR_ESTO_KARINA.CENTURI%c3%93N_EFECTO.ANTIBACTERIANO.I_N.VITRO.DIFERENTES.CONCENTRACIONES.EXTRACTO.ETAN%c3)

%93LICO.CAESALPINIA.SPINOSA.TARA.FRENTE.STREPTOCOCCU
S.MUTANS.ATCC35668.pdf

- 33.- Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute); M100-S23. 2013. Vol 33(1).
- 34.- Código de ética para la investigación. ULADECH. Versión 004 [Internet]. [citado 02 marzo 2021]. Disponible en:
<http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/7455/codigo-de-etica-paralainvestigacionv001.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- 35.- Manzini J. Declaración de Helsinki: Principios Éticos para la Investigación Médica Sobre Sujetos Humanos. Acta bioeth. [Online]. 2000; Vol.6(2): pp. 321-334. [citado 2017-11-24].
Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/s1726-569x2000000200010>.
- 36.- Clemente C, Paucar R. Actividad Antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus Molle L.* “Molle”. [Tesis para optar el Título Profesional]. Lima-Perú: Facultad De Farmacia Y Bioquímica; 2017.
Disponible en: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/530>.

ANEXOS

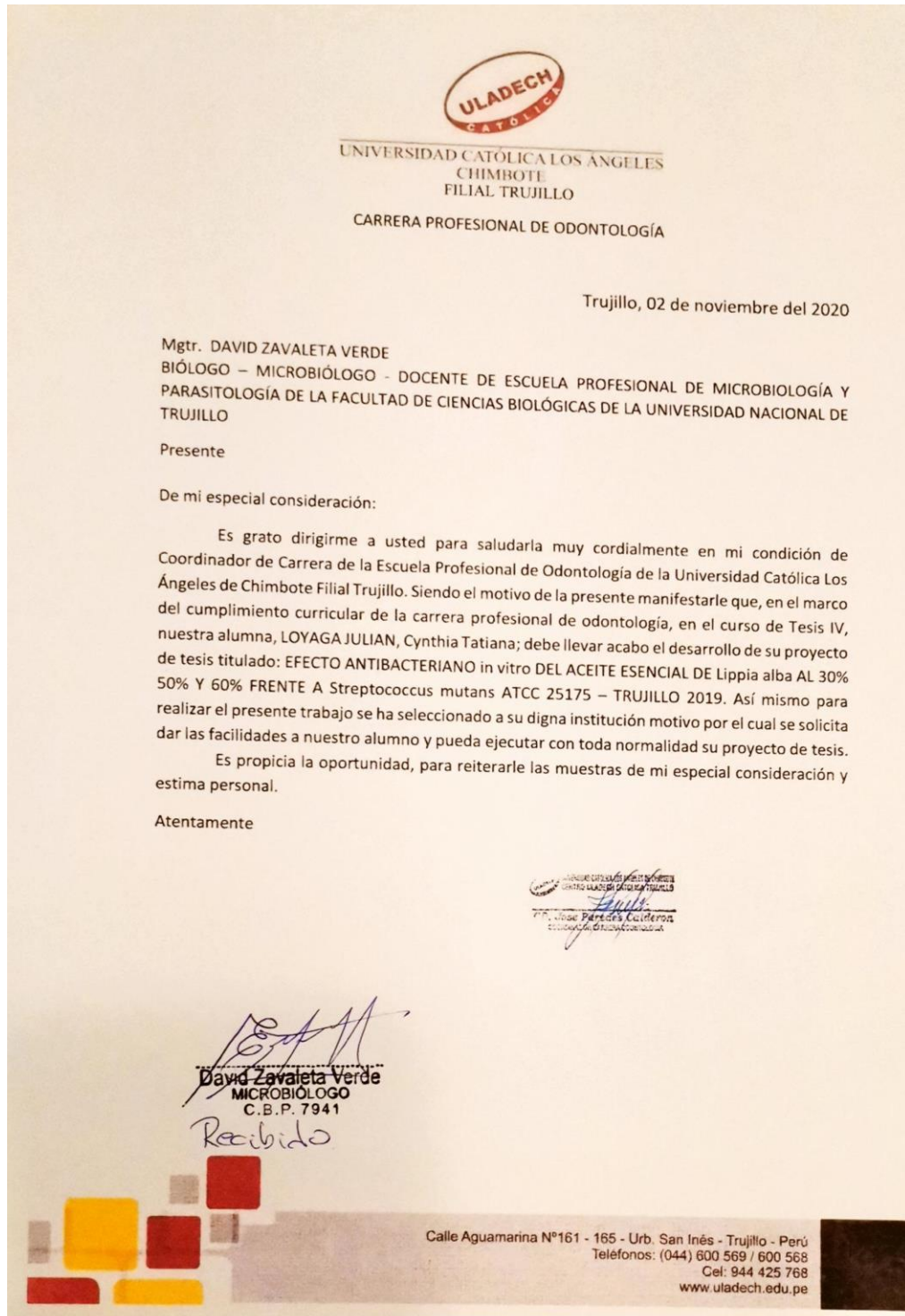
Anexo 1: Ficha de recolección de datos

Repeticiones	Concentración de los aceites esenciales de <i>Lippia alba</i> . Diámetro Halos de inhibición (mm)				
	Aceite 30%	Aceite 50%	Aceite 60%	Control Negativo	Clorhexidina 0.12%
1	10.7	15	22.7	0	19.2
2	12.3	13.8	17.7	0	17.6
3	11.9	12.6	17.5	0	16.7
4	11.4	13.7	14.4	0	14.2
5	8.5	13.1	15.4	0	14.9
6	11.1	14.7	19	0	17.6
7	11.4	15.7	17	0	16.9
8	10.5	12.6	15.9	0	15.8
9	11.8	13.9	21.4	0	19
10	12.1	14	16.2	0	16

**Anexo 2: Instrumento de medición, VERNIER DIGITAL marca MITUTOYO,
Modelo 500-196-20 ABSOLUTE Digimatic Caliper 0-150mm / 0-6", por estar
calibrado y validado con ISO de calidad 17025**



Anexo 3: Carta de Presentación



**Anexo 4: Constancia de colaboración de la Farmacéutica Dra. MARILÚ
ROXANA SOTO VÁSQUEZ**

CONSTANCIA

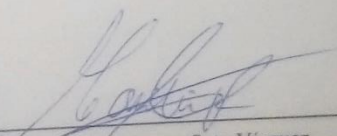
Yo, **Marilú Roxana Soto Vásquez**, Docente de la Cátedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727.

Dejo constancia de haber colaborado en la extracción del aceite esencial y en la preparación de las concentraciones de 30%, 50% y 60% del aceite esencial de *Lippia alba*, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, a la alumna **Cynthia Tatiana Loyaga Julián**, identificada con DNI 45516246 con domicilio legal en Víctor Raúl Mz. O Lote 14, Laredo – Trujillo, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, en la ejecución de la tesis titulada: “Efecto Antibacteriano del aceite esencial de *Lippia alba* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo 2019”.

Se expide esta constancia, a solicitud del interesado, para los fines que estime pertinentes.

Trujillo 14 de junio del 2019




Dra. Marilú Roxana Soto Vásquez
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Laboratorio de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo

**Anexo 5: Constancia de colaboración de DAVID ZAVALETA VERDE Dr.
Biólogo – Microbiólogo en la Ejecución del Proyecto de Investigación.**

CONSTANCIA

Yo, David Zavaleta Verde, Biólogo Microbiólogo y docente de la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 7941.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado con la alumna CYNTHIA TATIANA LOYAGA JULIAN, identificado con DNI 45516246, con domicilio legal en Víctor Raúl Mz "O" lote 14, Laredo -Trujillo; estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la Universidad Católica Los Angeles de Chimbote, en la ejecución del proyecto de investigación "Efecto antibacteriano de tres concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 Trujillo - 2019".

Trujillo 5 de junio del 2019



David Zavaleta Verde
MICROBIOLOGO
C.B.P. 7941

Anexo 6: Constancia de colaboración de DAVID CUBA CAMPOS, Ingeniero Estadístico en la Ejecución del Informe Final de Investigación.

CONSTANCIA

Yo, **DAVID JONATAN CUBA CAMPOS** con DNI: 45488304, Ingeniero Estadístico de la Universidad Nacional de Trujillo.

Dejo constancia de haber colaborado con la alumna **LOYAGA JULIAN CYNTHIA TATIANA**, identificada con DNI: 45516246, con domicilio legal Víctor Raúl Mz. "O" lote 14, Laredo- Trujillo, estudiante de la facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Odontología de la universidad Católica los Ángeles de Chimbote.

Se hace constar que colaboro con el análisis estadístico de la tesis titulada EFECTO ANTIBACTERIANO DE TRES CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE *lippia alba* FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo-2019.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado.

Trujillo, 24 de junio 2019.


.....
David J. Cuba Campos
ING ESTADÍSTICO
DNI 45488304
.....

Anexo 7: Constancia de Taxonomía Herbario Truxillense (HUT)



Herbarium Truxillense (Hut)

Universidad Nacional de Trujillo
Facultad de Ciencias Biológicas
Jr. San Martín 392, Trujillo-Perú



CONSTANCIA N° 101-2018-HUT

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT) DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO.

Da constancia de la determinación taxonómica de un (01) espécimen vegetal:

- **Clase:** Magnoliopsida
- **Subclase:** Asteridae
- **Superorden:** Magnoliophyta
- **Orden:** Lamiales
- **Familia:** Verbenaceae
- **Género:** *Lippia*
- **Especie:** *L. alba* (Mill. N.E.Br. ex Britton & P. Wilson)
- **Nombre vulgar:** Pampa Oregano

Muestra alcanzada a este despacho por Cynthia Taliana Loyaga Julián, identificada con DNI N° 45516246, con domicilio legal calle los Cipreses N° 12, Los Jardines-Laredo-Trujillo; estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica de los Ángeles de Chimbote, cuya determinación taxonómica servirá para la realización de Proyecto de Tesis: "Efecto Antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba* AL 30% 50% Y 60% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175".

se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Trujillo, 07 de junio del 2019

cc. herbario HUT



Dr. JOSÉ MOSTACERÓ LE
Director del Herbario HUT



E-mail: herbariumtruxillensehut@yahoo.com

Anexo 8: Resultados

Comparación del efecto antibacteriano de tres concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175”, determinado mediante el diámetro (mm) de los halos de inhibición del crecimiento, método Kirby Bauer.

Repeticiones	Tratamientos - Halos de inhibición (mm)				
	Aceite 30%	Aceite 50%	Aceite 60%	Control Negativo	Clorhexidina 0.12%
1	10.7	15	22.7	0	19.2
2	12.3	13.8	17.7	0	17.6
3	11.9	12.6	17.5	0	16.7
4	11.4	13.7	14.4	0	14.2
5	8.5	13.1	15.4	0	14.9
6	11.1	14.7	19	0	17.6
7	11.4	15.7	17	0	16.9
8	10.5	12.6	15.9	0	15.8
9	11.8	13.9	21.4	0	19
10	12.1	14	16.2	0	16
Promedio	11.17	13.91	17.72	0	16.79
p	0.053	0.672	0.392	*	0.859
Prueba de Normalidad (Shapiro-Wilk)	Normalidad	Normalidad	Normalidad		Normalidad

(*) Control negativo, es un constante y se ha desestimado

Anexo 09: Evidencia de la Ejecución del Proyecto de Tesis

Este proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo



Recolección de las hojas de *Lippia alba* del Jardín Botánico de la UNT

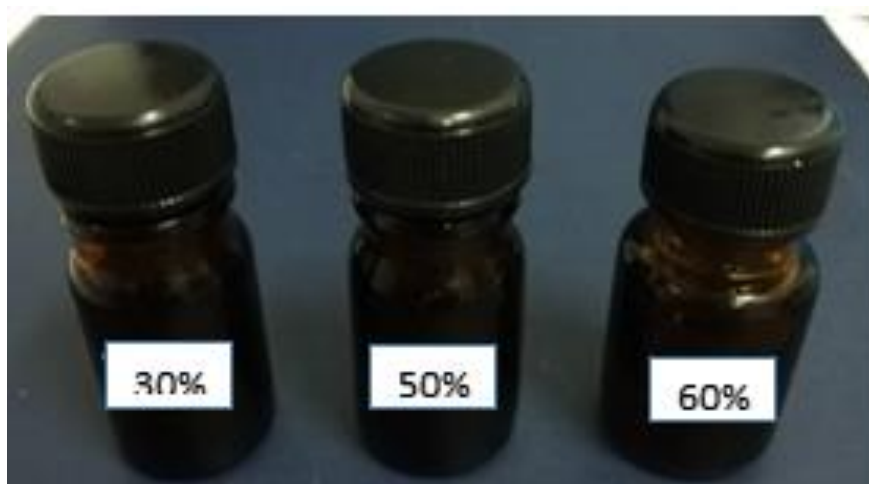


Selección, Lavado y Desinfección de la planta *Lippia alba*

Las hojas de *Lippia alba* se lavó con agua de caño y en seguida se desinfectó con hipoclorito de sodio al 0.5%. Posteriormente se realizó un enjuague de la planta con suficiente agua destilada estéril

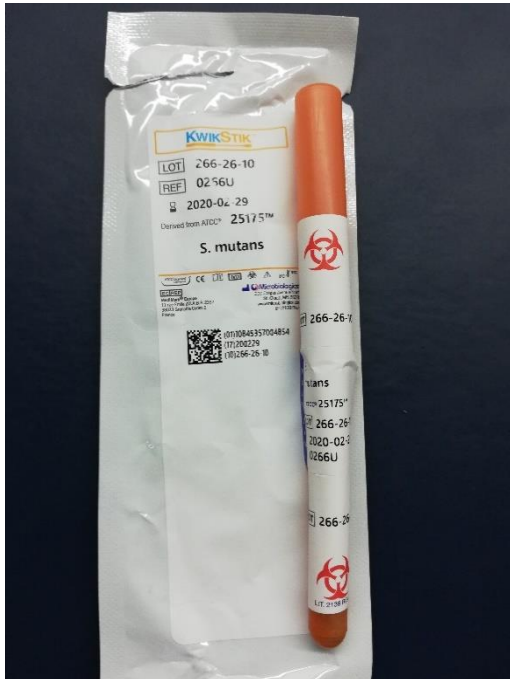
Extracción del aceite esencial de *Lippia alba*

Se armó el equipo de destilación, sometiendo las muestras a una corriente de vapor de agua sobrecalentada, arrastrando la esencia que posteriormente por acción del refrigerante, se condensó.

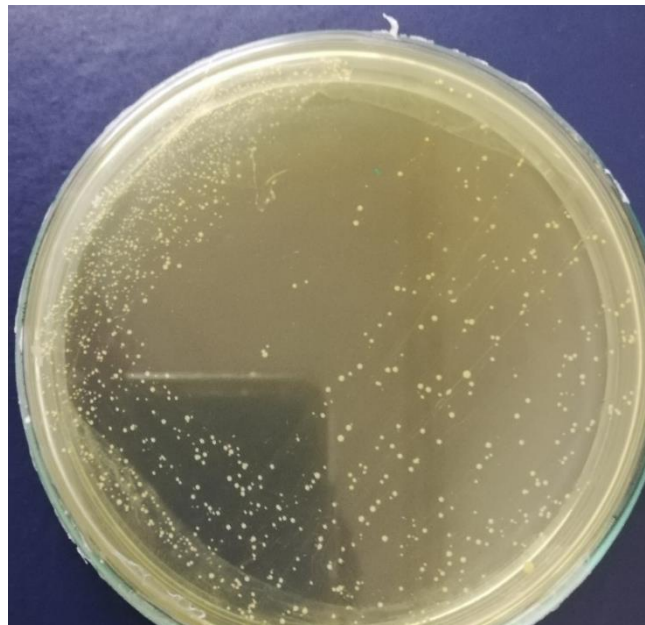


Aceite esencial de *Lippia alba*
en diferentes concentraciones

Sistema conteniendo cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.



Tubo con medio de cultivo BHI, conteniendo la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 reactivada.



Placa de Petri con medio de cultivo TSA con colonias típicas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Tubo conteniendo *Streptococcus mutans* ATCC 25175 estandarizado a la concentración 1.5×10^8 UFC/ml

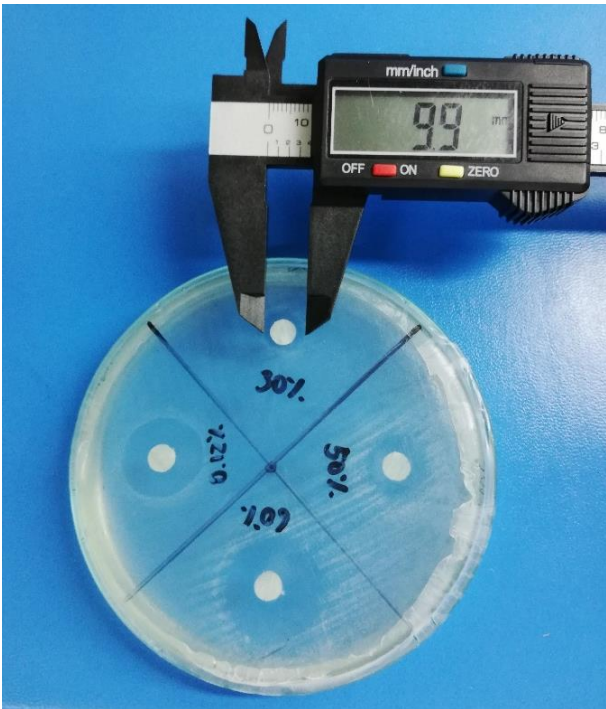
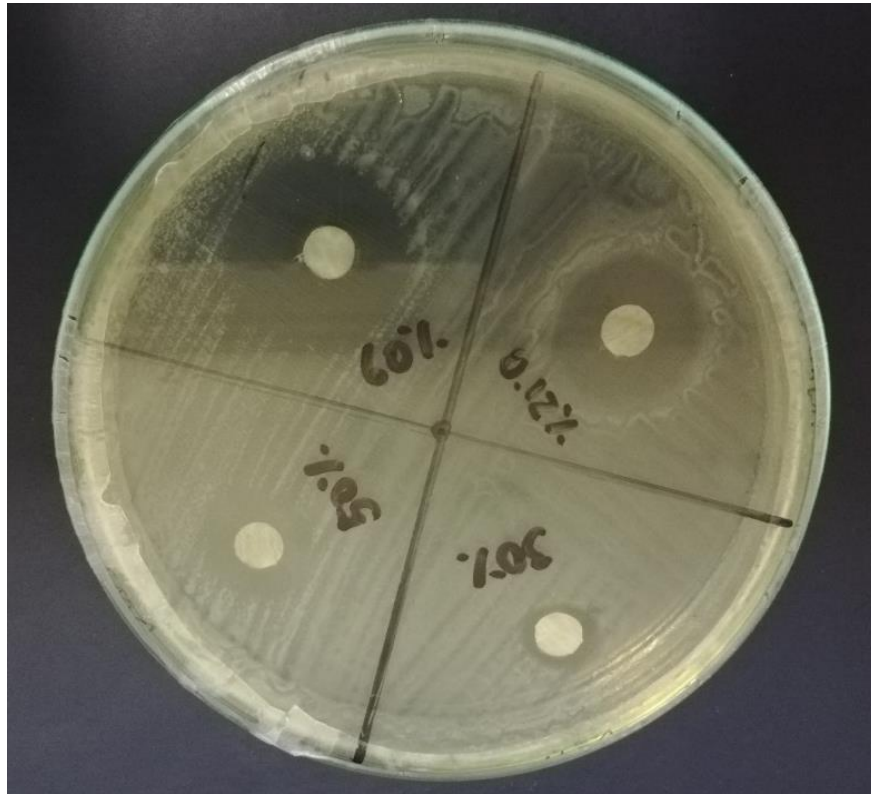




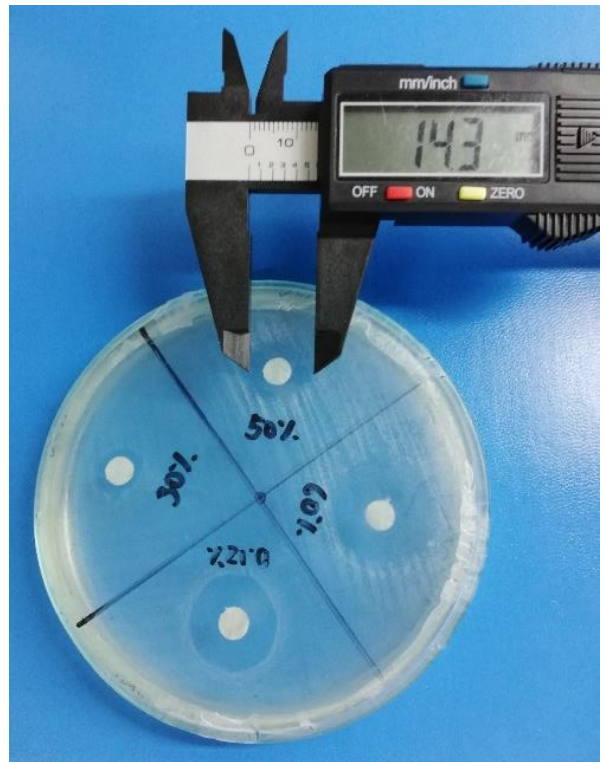
Inoculación de las placas y preparación de los discos de papel filtro whatman número 3 estériles

Lectura de los resultados: Se midió los halos de inhibición del aceite de *Lippia alba* a diferentes concentraciones, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175

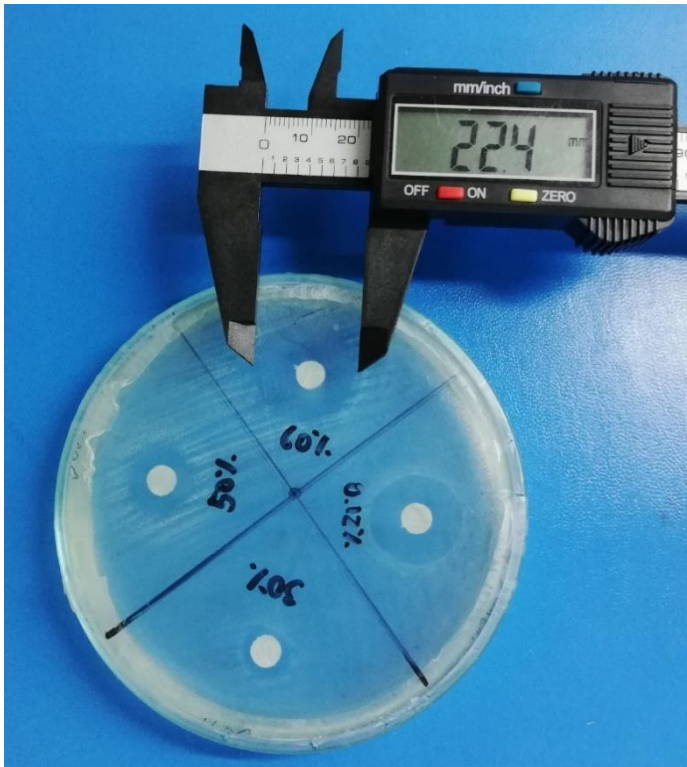




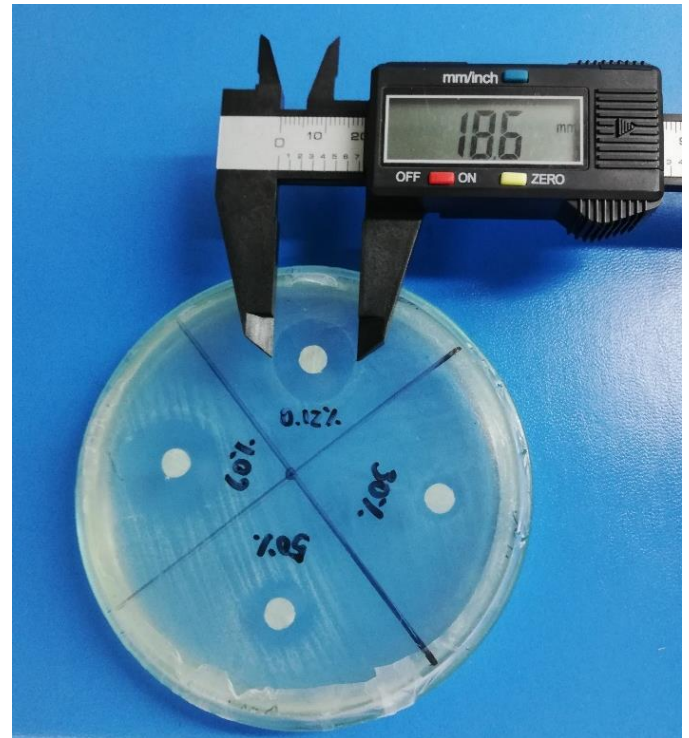
Halos de inhibición al 30%



Halos de inhibición al 50%



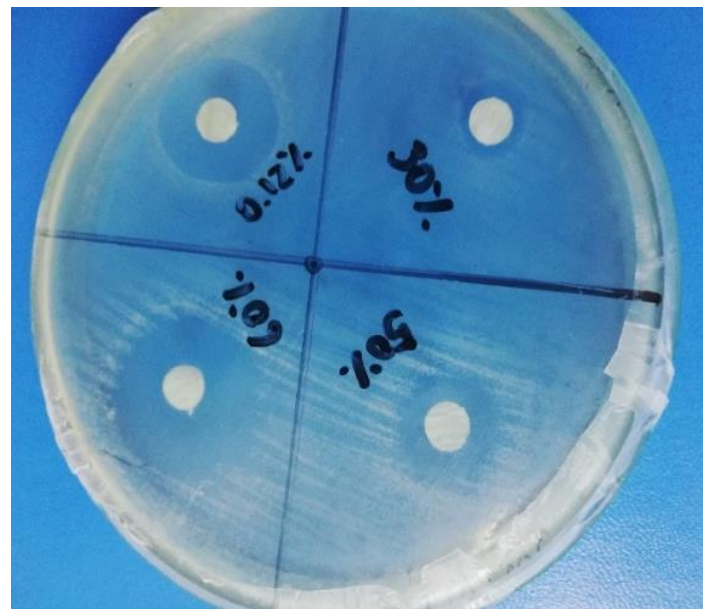
Halos de inhibición al 60%



Halos de inhibición del grupo control
(Clorhexidina al 0.12%)



Halos de inhibición del grupo control
negativo etanol al 70%



Halos de inhibición en diferentes
concentraciones