

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

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

**“EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL
ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* SOBRE
Streptococcus mutans ATCC 25175, TRUJILLO 2017”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA

AUTOR:

KELLY LISSETTE SANCHEZ AREVALO

ASESOR:

MGTR. CESAR ABRAHAM VASQUEZ PLASENCIA

TRUJILLO- PERÚ

2019

TÍTULO DE LA TESIS

**“EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO,
DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium
aromaticum* SOBRE *Streptococcus mutans*
ATCC 25175, TRUJILLO 2017”**

Equipo de trabajo

Investigador principal: Kelly Lissette Sánchez Arévalo

Asesor: Mgtr. César Abraham Vásquez Plasencia

Firma del jurado y asesor

Dr. Elías Ernesto Aguirre Siancas
Presidente

Mgtr Edwar Richard Morón Cabrera
Miembro

Mgtr. Juan Luis Pairazamán García
Miembro

Mgtr. César Abraham Vásquez Plasencia
Asesor

Agradecimiento

A DIOS por permitir cumplir mis metas, por cuidar de mi familia y de mi persona.

A mis padres Jaime Sánchez Cruzado y María Arévalo Abad por confiar en mí, por brindarme su apoyo incondicional en mi preparación.

A mis hermanos, por ser mis amigos y consejeros en momentos difíciles y darme ánimos para seguir adelante.

A mi asesor César Vásquez Plasencia por guiarme en el desarrollo y realización de mi tesis.

Dedicatoria

A mis padres, Jaime Sánchez Cruzado y María Arévalo Abad por guiarme, por brindarme sus enseñanzas y apoyo, a ustedes que son el motivo de mí esfuerzo para lograr ser profesional.

A mis hermanos y tíos por sus palabras de apoyo y por ser las veces de mí querido padre en su ausencia.

A Dios por permitirme cumplir mis metas, por proporcionar de vida y salud a mis seres queridos y a mi persona.

Resumen

La caries dental es uno de los continuos padecimientos de la población, por lo que en la búsqueda de nuevos recursos, se realizó un estudio experimental, in vitro, en el que se empleó cepas de *Streptococcus mutans* y aceite esencial de *Syzygium aromaticum*. Este estudio se realizó con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano, in vitro, del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), en concentraciones de 50%, 70%, 90%. El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* se obtuvo a través del método de destilación por arrastre de vapor de agua. Se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175. La reactivación se realizó sembrando el cultivo en un tubo con Caldo Brain Heart Infusion (BHI), y Agar Tripticasa Soya (TSA), se incubó bajo condiciones de microanaerobiosis, y se evaluó a través del método de sensibilidad bacteriana de Kirby Bauer. Para determinar la efectividad del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* se utilizó la prueba estadística ANOVA previo análisis de normalidad, distribución de valores y Test de Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se determinó la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* en concentraciones que abarcan el 50%, 70%, 90% sobre *S. mutans*. La concentración de 90% mostró mayor efectividad, obteniendo un halo de inhibición de 31.8mm, en comparación del 70% y 50%. Se concluyó que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 90% tiene mayor efectividad antibacteriana al inhibir el crecimiento del *S. mutans* ATCC 25175.

Palabras clave: *Syzygium aromaticum*, in vitro, *Streptococcus mutans*, sensibilidad, bacteriana.

Abstract

Dental caries is one of the continuous suffering of the population, so in the search for new resources, an experimental study was carried out, in vitro, in which strains of *Streptococcus mutans* and essential oil of *Syzygium aromaticum* were used. This study was carried out with the objective of determining the antibacterial effect, in vitro; of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove), in concentrations of 50%, 70%, 90%. The essential oil of *Syzygium aromaticum* was obtained through the method of steam distillation. A freeze-dried culture of the *S. mutans* strain ATCC 25175 was used. The reactivation was carried out by seeding the culture in a tube with Brain Heart Infusion Broth (BHI), and Trypticase Soy Agar (TSA), was incubated under microanaerobiosis conditions, and was evaluated through the bacterial sensitivity method of Kirby Bauer. To determine the effectiveness of the essential oil of *Syzygium aromaticum*, the ANOVA statistical test was used after analysis of normality, distribution of values and Tukey test, with a level of significance of $p < 0.05$. The antibacterial effectiveness of the essential oil of *Syzygium aromaticum* in concentrations ranging from 50%, 70%, and 90% on *S. mutans* was determined. The concentration of 90% showed greater effectiveness, obtaining an inhibition halo of 31.8mm, compared to 70% and 50%. It was concluded that the essential oil of 90% *Syzygium aromaticum* has greater antibacterial effectiveness when inhibiting the growth of *S. mutans* ATCC 25175.

Key words: *Syzygium*, in vitro, *Streptococcus mutans*, sensitivity, bacterial.

Contenido

1. Título de la tesis.....	ii
2. Equipo de trabajo.....	iii
3. Hoja de firma del jurado y asesor.....	iv
4. Hoja de agradecimiento.....	v
5. Hoja de dedicatoria.....	vi
6. Resumen.....	vii
7. Abstract.....	viii
8. Contenido.....	ix
9. Índice de tablas.....	x
10. Índice de gráficos.....	xi
I. Introducción.....	1
II. Revisión de la literatura.....	4
III. Hipótesis.....	20
IV. Metodología.....	21
4.1. Diseño de la investigación.....	21
4.2. Población y muestra.....	21
4.3. Definición y operacionalización de variables.....	23
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	24
4.5. Plan de análisis.....	29
4.6. Matriz de consistencia.....	30
4.7. Principios éticos.....	32
V. Resultados.....	33
5.1. Resultados.....	33
5.2. Análisis de resultados.....	36
VI. Conclusiones.....	39
Aspectos Complementarios.....	40
Referencias Bibliográficas.....	41
Anexos.....	46

Índice de tablas

Tabla 1. *Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de Syzygium aromaticum a las concentraciones de 50%, 70%, y 90% y los controles positivo y negativo, frente a Streptococcus mutans ATCC25175.....33*

Tabla 2. *Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de Syzygium aromaticum a las concentraciones de 50%, 70%, y 90% y los controles positivo y negativo, frente a Streptococcus mutans ATCC 25175.....34*

Índice de gráficos

Gráfico 1. <i>Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de Syzygium aromaticum a las concentraciones de 50%, 70%, y 90% y los controles positivo y negativo, frente a Streptococcus mutans ATCC25175.....</i>	54
--	-----------

I. Introducción

La caries dental es una enfermedad que en la actualidad representa un problema mundial, por ser una de las enfermedades orales más comunes sin importar la edad de quienes la padecen. La caries corresponde a una enfermedad infecciosa, transmisible, producida por la concurrencia de bacterias específicas en un huésped y un ambiente, como la cavidad oral.¹

En la actualidad se ha implicado al *Streptococcus mutans* como el principal y más virulento microorganismo responsable de la caries dental así como también existen otros microorganismos de gran importancia, tales como el *Lactobacillus*, *Actinomyces* y otros tipos de *Streptococcus* que también participan.¹

La Organización Mundial de la Salud reconoce la importancia de las plantas medicinales en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también la relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tiene un costo muy inferior a la síntesis de nuevos fármacos. El regreso del interés científico sobre las plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado una revalorización de su empleo en muchas partes del mundo.²

Una de las plantas que presenta propiedades antibacterianas de uso médico es *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) el cual es una especie perteneciente a la familia Myrtaceae, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales. Es originaria de Indonesia, y actualmente se cultiva en Brasil, Haití, India, Kenia, Madagascar, Malasia, Mauricio, México, Seychelles, Sri Lanka, Tanzania, entre

muchos otros países.³

El aceite de clavo de olor ha sido ampliamente investigado debido a su popularidad, como estimulante contra trastornos digestivos, así como también, posee muy variados efectos dentro de las que destacan el antiséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, anestésico y antimutagénico.³

En odontología se usa como preparado de óxido de zinc y eugenol. Es por ello que el presente estudio buscó determinar la efectividad antibacteriana invitro del aceite esencial *Syzygium aromaticum* frente al *Streptococcus mutans*. Los resultados del presente estudio servirán de base para la realización de futuras investigaciones y la elaboración de productos orales alternativos que se encuentren accesibles al alcance de toda la población, especialmente aquellas de bajos recursos económicos.³ Por lo tanto éste proyecto se realizó con la finalidad de evaluar el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), en concentraciones de 50%, 70%, 90% sobre *S. mutans ATCC 25175*.

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* se obtuvo a través del método de destilación por arrastre de vapor de agua. Se utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *S. mutans ATCC 25175*. La reactivación se realizó sembrando el cultivo en un tubo con Caldo Brain Heart Infusion (BHI), y Agar Tripticasa Soya (TSA), se incubó bajo condiciones de microanaerobiosis, y se evaluó a través del método de sensibilidad bacteriana de Kirby Bauer.⁴ Se determinó la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* en concentraciones que abarcan el 50%, 70%, 90% sobre *S. mutans*. La concentración de 90% mostró mayor efectividad, obteniendo un halo de inhibición de 31.8mm, en comparación del 70% y 50%. Por

tal motivo se concluyó que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 90% tiene mayor efectividad antibacteriana al inhibir el crecimiento del *S. mutans* ATCC 25175.

II. Revisión de la literatura:

1.1 Antecedentes

Díaz OV⁵ (Ecuador, 2016) "Efecto inhibitor del aceite esencial de clavo de olor "*Syzygium aromaticum*" como agente antimicrobiano, sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro". El aceite esencial de *S. aromaticum* se obtuvo a través de la técnica de destilación por arrastre de vapor de agua, en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%. Las cepas de *S. mutans* se obtuvieron a través del laboratorio en estado inactivo. Se realizó la suspensión del *S. mutans* y se colocó en un tubo de ensayo. La suspensión, posteriormente fue sembrada en placas con Agar de Muller Hinton. Se utilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro los cuales fueron embebidos con 20 ul, de cada concentración (25%, 50%, 75%, 100%). Seguidamente se introdujeron en jarra Gaspack, en anaerobiosis, donde permaneció a una temperatura de 35°C, durante 24 horas. Los resultados demostraron que el aceite esencial de clavo de olor al 25% presentó un halo de inhibición de 20mm, al 50% presentó un mayor halo de inhibición de 22mm, al 75% presentó su mayor halo de inhibición de 21mm y al 100% presentó su mayor halo de inhibición de 22mm, por lo que se concluye que la concentración del 50% es más efectiva.

Gamboa J et al⁶ (Perú, 2015) "Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*". En el presente estudio se evaluó la efectividad del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, para lo cual se utilizó brotes de clavo de olor a través del método de destilación por arrastre con vapor de agua,

luego se prepararon concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% utilizando como solvente emulsificante, Tween 80. Se emplearon cada uno de los cultivos de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus* y se estandarizaron a una turbidez equivalente a 1.5×10^8 células/mL del nefelómetro de MacFarland, los cuales constituyeron los inóculos. La efectividad del aceite esencial de *S. aromaticum* sobre los microorganismos se determinó por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% de aceite; utilizando cloranfenicol (30ug/disco) como control positivo y Tween 80 como control negativo. El estudio concluyó que el aceite esencial al 40% presenta un notable efecto antibacteriano.

Rodríguez O et al.⁷ (México, 2014) " Obtención del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, identificación del eugenol y su efecto sobre *S. mutans*". Se determinó el efecto de *S. aromaticum* frente a *S. mutans*. Las cepas de *S. mutans*, fue proporcionada por el laboratorio de biología molecular. Las cepas se cultivaron en agar de Muller Hinton durante 24 horas a 37° C. Los botones de *S. aromaticum* se obtuvieron en centros de venta reconocidos. El aceite se preparó a través del método de hidrodestilación y se evaluó su actividad antibacteriana contra células plantónicas de *S. mutans* ATCC 700611, realizándose diluciones seriadas; desde 15 hasta 1000µg/mL, comparándose con clorhexidina al 0.12% y dimetilsulfóxido, además se determinó la CMI. Mostró mayor actividad antimicrobiana a las concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL. La CMI y CMB del aceite, resultó a 125 y 250 µg/mL respectivamente. El estudio demostró la capacidad del aceite esencial de clavo

para el crecimiento inhibitorio de *S. mutans*. Se demostró al eugenol como compuesto de mayor abundancia y con actividad bactericida en un rango de concentración de 125-1000 µg / ml, con CIM 125 µg /mL.

Sánchez L et al.⁸ (El Salvador, 2013) Actividad cariosa y efectividad antimicrobiana del Aloe Vera y Syzygium aromaticum sobre Streptococcus mutans, aislado de la cavidad oral" Se determinó la efectividad antimicrobiana del *S. aromaticum* y *Aloe vera* frente a *S. mutans*. Las muestra bacteriana se tomó de piezas dentales afectadas y se trasladó en un medio de cultivo de transporte Cary Blair, para ser procesadas y se sembró en un medio de nutritivo, transcurrido 24 horas de incubación se procedió a sembrar en un medio de cultivo selectivo para aislar a *Streptococcus mutans* confirmando la identidad de la especie con una cepa control. El aceite esencial se obtuvo a través del método de destilación por arrastre de vapor de agua". Los resultados mostraron que el aceite de *S. aromaticum*, posee efectividad bacteriostática frente al *S. mutans* en concentraciones, desde el 50% hasta el 80%. En concentraciones del 90% al 100% se determinó un efecto bactericida. El estudio concluyó que el *Aloe vera* no posee ningún efecto inhibitorio o bactericida sobre *S. mutans*, a diferencia del *S. aromaticum*, que posee un efecto bacteriostático desde el 20%.

Sethi S et al.⁹ (India, 2013) "Actividad antimicrobiana de especias contra patógenos aislados transmitidos por los alimentos". El propósito del estudio consistió en evaluar la actividad antimicrobiana del *S. aromaticum* en extracto metanólico y otras especias contra diversos patógenos. Se utilizó 100 gr de

Syzygium aromaticum para la realización del extracto, usando el método de difusión. Las cepas se inocularon en caldo nutriente y se incubaron a 37⁰C, durante 24 horas. Los microorganismos se sembraron en respectivos medio por método de placa de propagación 10 µl (10 células / ml) por 24 horas en caldo de crecimiento bacteriano. El extracto metanólico de *S. aromaticum* formó halos de inhibición de hasta 19 mm en bacterias tales como: *E.Coli*, *B. subtilis*, *Ps.florescens*, *S.marscens* *C.frendii*, *K.pneumo*, *S.aureus*. *Pr.vulgaris*. El estudio concluyó demostrando que el extracto de *Syzygium aromaticum* posee una mayor efectividad antibacteriana en comparación a otras especies.

Rana I et al.¹⁰ (India, 2011), "Evaluación de la actividad antifúngica en aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (l.) por extracción, purificación y análisis de su componente principal eugenol". El presente estudio tenía por finalidad evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial y analizar el eugenol. El aceite esencial, se preparó a través del método de destilación con vapor de agua. Los cultivos se mantuvieron en agar de patata dextrosa (PDA), medio inclinado suplementado con extracto de levadura al 0,1% y se almacenaron como cultivos activos a 4 ° C. Los hongos se cultivaron en Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Se prepararon suspensiones de esporas fúngicas que contenía 0,05% de Tween-20. Se observó una considerable variación de entre 12-22 mm, en los tamaños de halos de inhibición entre los hongos aislados. En sus investigaciones concluyó que el aceite esencial de *S. aromaticum* posee actividades antifúngicas frente a especies de hongos y levaduras, por lo tanto concluyó que el aceite esencial de clavo es altamente antifúngico para todas las

especies de hongos probados.

Gupta C et al.¹¹ (India, 2008) “Comparación de las actividades antimicrobianas del aceite de clavo y su extracto en algunos microbios transmitidos por los alimentos”. El estudio tenía por finalidad comparar la actividad del extracto etanólico (50%) y de aceite de clavo olor como agentes antimicrobianos naturales. La efectividad del aceite de clavo y su extracto (50% de etanol) se probó contra diez bacterias (siete Gram positivas y tres Gram negativas) y siete hongos mediante ensayos a través del método de difusión en agar-pozo. Se demostró la efectividad del aceite con una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2.5% (v/v) contra *Staphylococcus epidermidis* Y *Staphylococcus sp.* Entre los hongos, *Aspergillus niger*, es altamente sensible al aceite. Se concluyó que el aceite de clavo es más efectivo en comparación con el extracto de clavo.

2.2 Bases teóricas de la investigación:

Caries dental

1. Concepto

La caries es una enfermedad causada por múltiples factores, que implican una relación entre los dientes, la saliva y la microflora oral; para la formación de la caries se requiere de un medio favorable, es decir un huésped susceptible, que posea una microflora oral cariógena y un sustrato adecuado; estos componentes deben estar presentes en un periodo de tiempo determinado, para finalmente provocar la aparición de ésta enfermedad.¹² Uno de los pasos más significativos para la producción de caries dental, es la adhesión inicial de los microorganismos a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la actividad conjunta entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva que son absorbidas por el esmalte dental.¹³

2. Etiología de la caries dental

La etiología de la caries dental es multifactorial, por lo que es necesaria la acción en conjunto de estos factores para el inicio de una destrucción dentaria.¹⁴

Factores biológicos

- **Microorganismos:** Los microorganismos poseen un papel esencial en la etiología de la caries dental, ya que en la cavidad oral encontramos una de las más variadas y concentradas poblaciones bacterianas. Entre los patógenos presentes en la boca encontramos a tres especies

principalmente relacionadas con la caries dental: Streptococcus, Lactobacillus y Actinomyces.¹⁴

En la actualidad la comunidad bacteriana, metabólicamente integrada, que se une a las superficies, vivas o inertes, blanda o dura, es definida como biofilm. Esta agrupación bacteriana se encuentra organizada, por ende los microorganismos se comunican entre sí, llegando a producir gradientes localizadas que afectan la población en general.¹⁴

- **Huésped:** Los factores ligados directamente al huésped, son la saliva y los tejidos dentarios.¹⁴
- **Dieta:** Representa un rol muy importante en el metabolismo bacteriano, ya que la presencia de hidratos de carbono proveniente de la dieta se fermentan favoreciendo a la colonización bacteriana y a la adhesividad de la placa.¹⁴

3. Incidencia

En la actualidad la Organización Mundial de salud nos indica, que entre el 60% y 90% de los niños en edad escolar y cerca el 100 % de los adultos, en términos mundiales presentan caries dental, y a menudo es acompañada de dolor o sensación de molestia, así como también menciona que al rededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y 74 años no tiene dientes naturales.¹⁵

4. Fisiopatología de la caries

La colonización bacteriana, requiere del previo establecimiento de una fina capa salival proteica sobre la superficie dentaria, denominada: película

adquirida. Al contacto con los depósitos microbianos en la estructura dentaria, y la inestabilidad entre la saliva y la placa dental, resulta un deterioro de los minerales dentarios, cuyo signo es la destrucción de tejidos duros, por lo tanto se le clasifica a ésta como una enfermedad irreversible y transmisible.¹²

En algunas patologías, la capacidad bacteriana para formar una estructura compleja multidimensional conocida como biopelícula desempeña un papel muy importante. Dentro de los principales agentes causantes de esta enfermedad es la bacteria *Streptococcus mutans*, que posee la capacidad de colonizar la cavidad oral y también de formar biopelículas bacterianas.¹⁶

Las propiedades adicionales que permiten a *S. mutans* colonizar la cavidad oral incluyen la capacidad de sobrevivir en un ambiente ácido, por lo tanto, uno de los muchos factores etiológicos de la caries dental, es éste microorganismo, es la habilidad de *Streptococcus mutans* en adquirir nuevas propiedades que permiten la expresión de determinantes de patogenicidad.¹⁶

La bacteria *Streptococcus mutans* y la ingesta descontrolada de carbohidratos refinados, como el azúcar y el biofilm dental. Al ser la etiología de la caries de naturaleza multifactorial, su tratamiento requiere la implementación de estrategias tanto de educación para la higiene, orientación nutricional y la búsqueda de nuevas formas de prevención para la disminución como enfermedad.¹⁷

Streptococcus mutans

1. Microflora oral

La microflora oral es un ecosistema complicado que posee una extensa variedad de microorganismos. La boca es colonizada por diversas bacterias

antes de la erupción dentaria, no obstante, los recién nacidos son fundamentalmente libres de microorganismos. La placa dental se desarrolla en los niños, con la erupción dentaria, sobre las superficies exteriorizadas, las cuales llegan a estar revestidas por una película invisible que se encuentra constituida primordialmente por glicoproteínas salivales, por lo tanto de no realizar las medidas de higiene oral necesarias, las superficies dentarias almacenan gran cantidad de microorganismos.¹⁸

Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biofilm o biopelícula) con todas sus funciones, interacciones y propiedades.¹⁸

En la cavidad oral habitan principalmente (aproximadamente 1010 bacterias, siendo el 60% cultivables) entre 500 y 700 especies, colonizando mucosa y dientes formando la placa bacteriana, uno de estos miembros pertenece al género *Streptococcus*. En la actualidad se considera a diversos grupos de microorganismos influyentes en el periodo inicial de la caries dental (estreptococos del grupo *S. mutans*, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*) de los cuales, *Streptococcus mutans* es uno de los agentes más importantes relacionado a la cavidad oral.¹⁸

En diversas patologías infecciosas, es necesaria la colonización de un patógeno previamente a la aparición de la infección. Existe un rango de factores de virulencia muy significativa para la instauración del *Streptococcus mutans* en la compleja comunidad microbiana de la biopelícula dental. La evidencia y diversos estudios demuestran que una forma de transmisión de *S.*

mutans durante los primeros años de vida es la que se produce por el contacto directo de madre a hijo (transmisión vertical), mientras que el contacto con otros familiares, incluidos: Padre, hermanos y demás posibles cuidadores constituye una segunda vía de transmisión (transmisión horizontal) que es de importancia durante edades posteriores.¹⁸

2. Características de *Streptococcus mutans*

Esta bacteria *es* un coco Gram positivo, organizado en cadena, no móvil, catalasa negativo, generador de ácido láctico, con la facultad en modificar el medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la elaboración de ácido, siendo estos el ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico. Cuando es generada la producción de carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa, estos transitan a través de la placa dental hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, estos se encargan de disolver velozmente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales, a su vez, difunden fuera del esmalte.¹⁸

3. Caries dental y *S. mutans*

La caries dental es una patología infecciosa, transmisible de la cavidad oral, en la que los *Streptococos mutans* realizan una labor muy importante. En diversas infecciones es necesaria la colonización bacteriana previamente al inicio de la infección. En la película dental los componentes causantes de virulencia bacteriana son importantes para la formación de *Streptococcus mutans* en la comunidad bacteriana.¹⁷ Estos factores de virulencia de *S. mutans*, poseen una estrecha relación con las diversas especies, lo cual es

esencial, ya que juega una importante labor en la colonización, debido a los diferentes genotipos de un mismo individuo y la expresión particular que puedan o no influenciar su virulencia y su capacidad para mantenerse bajo diferentes condiciones ambientales. La labor del estreptococo del grupo mutans, especialmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en la etiología de la caries ha sido ampliamente analizado y justificado.¹⁹

El *S. mutans* es considerado como el microorganismo cariígeno por excelencia, por su especial capacidad de colonizar superficies duras. Se aísla en la cavidad oral, sobre todo a partir de placas supragingivales, radiculares y saliva.

Está demostrado su importancia en las endocarditis sub agudas, representando entre el 7-14% de todas las originadas por los estreptococos.¹⁹

Para controlar la placa bacteriana, existen agentes químicos que tienen la capacidad de reducir o retardar su formación, uno de estos es el Digluconato de clorhexidina, que también suele utilizarse para el control químico como antiséptico.²⁰

Clorhexidina

1. Concepto

La clorhexidina es un antiséptico derivado de una biguanida de carga positiva, con gran sustantividad y amplio espectro de actividad antibacteriana.²¹

2. Características

El digluconato de clorhexidina posee una molécula bicatiónica simétrica consistente en dos anillos: cuatro clorofenil y dos grupos bisguanida

conectados por una cadena central de decametileno (clorofenil bisguanida).²²

En odontología se empleó originalmente para higiene oral y como material irrigación en endodoncia, luego llegó a demostrarse que un enjuague de 60 segundos, por dos veces al día con solución de digluconato de clorhexidina al 0,2% en carencia de cepillado normal, inhibía la producción de placa y consecuentemente el desarrollo de enfermedad gingival.²²

3. Propiedades

El Digluconato de clorhexidina presenta propiedades muy importantes las cuales son ideales para su utilización. En odontología destacan las siguientes²⁰

- Efecto Bactericida: En altas concentraciones, induce a la muerte bacteriana.
- Efecto Bacteriostático: En bajas concentraciones, impide la reproducción bacteriana.
- Actividad antibacteriana de amplio espectro: Es efectivo contra un amplio rango de bacterias gram positivas, gram negativas, levaduras, hongos.
- Sustantividad: Tiene la capacidad de unirse a distintas localizaciones de la boca, para liberarse lentamente en forma activa manteniendo niveles terapéuticos

Syzygium aromaticum

1. Geografía

El *Syzygium aromaticum* es una especie nativo de Indonesia, en la actualidad se cultiva en Brasil, Haití, India, Kenia, Madagascar, México, Seychelles,

Tanzania, entre otros.^{3,8}

2. Altura

El árbol de clavo de olor es sólido, que posee un desarrollo de hasta una altura de 10 a 20 metros. Sus hojas son lanceoladas e inflorescencias racimosas (tirso). Las yemas florales originalmente poseen una coloración pálida, que de forma progresiva llegan a tornarse de color verde, para finalmente adquirir un color rojizo brillante, para luego encontrarse listos para ser recolectados. Generalmente cuando la flor logra alcanzar una longitud de 1,5 a 2 cm, es cosechada. Se componen de un largo receptáculo que posee al ovario; sobre el receptáculo se incorporan los verticilios florales: cuatro sépalos cuatro pétalos y gran cantidad de estambres.⁸

3. Composición fitoquímica

El botón de flor posee el aceite esencial, el cual está constituido por los siguientes elementos; monoterpenos delta-cadineno, cuminaldehído, fenchona, geraniol, 6-meti-hept-5-en-2-ona, beta-pineno y alfa-tuyeno; los sesquiterpenos gama- cadineno, delta-cadinol, calame-neno, beta-cariofileno, alfa-copaeno, alfa-cubeneno, alfa-humuleno, alfa, beta y gamma-muroleno, palustrol y beta-selineno; los componentes benzílicos acetofenona, benzaldehído, 3-metoxi-benzaldehído, éster benzílico del ácido benzoico, esterres metílico etílico y propílico del ácido benzoico, éster benzílico del ácido salicílico y acetato de eugenol; y la lactona gama- decalactona.^{3,8}

El aceite esencial se encuentra formado en un 15-20% de sesquiterpenos, esterres en 20%, eugenol, fenoles, óxidos, entre otros componentes;

flavonoides, esteroides, ácidos fenólicos, triterpenos. Así como posee ácido eugenólico o cariofílico, el cual es un líquido oleoso, obtenido de la esencia de clavos (comprendido en proporciones de 70 a 90%), el cual también presenta, tanino, aceite esencial volátil, alcohol metílico, cariofileno, furfenol y vainillina. El elemento causante del aroma del clavo de olor es el eugenol, el principal componente del aceite esencial y está demostrado que posee diversas propiedades antisépticas y anestésicas.^{3,8}

4. Clasificación botánica²³

Nombre científico: *Eugenia caryophyllus* – *Syzygium aromaticum*

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae.

5. Propiedades del *S. aromaticum*

El *Syzygium aromaticum* es ampliamente empleado como especie sazonzante gastronómico. El clavo de olor ha sido utilizado como remedio natural para gran número de enfermedades o dolencias.²³ El uso tradicional del clavo es respaldado por sus numerosas propiedades que se han descrito en diversas investigaciones científicas, en las que destacan su actividad antioxidante, hipotensora, analgésica, antibacteriana, antiinflamatoria y antifúngica, además de la actividad antimicrobiana del aceite esencial con otras plantas.⁹

6. Aceite esencial de *Syzygium aromaticum*

El destilado del aceite esencial de *S. aromaticum* presenta una coloración transparente, que debido a la acción de la luz y el oxígeno llega a adquirir un color amarillo claro.²³

La Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado el uso del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* como aromatizante en alimentación, anestésico en cementos dentales, en fragancias y aromaterapia, así también ha sido definido por la Environmental Protection Agency (EE.UU) como pesticida de mínimo riesgo, sin embargo es importante recalcar la citotoxicidad de compuestos como eugenol, ha sido demostrada en células hepáticas de ratas y ratones.²³ La sustracción del aceite esencial de la planta consiste en la destilación a baja o alta presión a través de la utilización de agua (hidrodestilación), corrientes de vapor, o con el uso de dióxido de carbono líquido. Es relevante tener en cuenta que la calidad del producto final puede modificarse en calidad, cantidad y composición, debido a factores como las características de la tierra de lugar de cultivo, edad y estado del ciclo vegetativo.²⁴

7. Mecanismo de acción de los aceites esenciales

El efecto antibacteriano de los aceites esenciales han sido extensamente investigadas, sin embargo el mecanismo de acción no ha sido estudiado minuciosamente, por lo que a su efectividad se le ha atribuido a la acción conjunta de diversos componentes que posee. Una de las características más importante del aceite, es que penetra a través de las membranas celulares, produciendo la alteración de sus estructuras haciéndolas permeables, llegando

a provocar la muerte celular.²⁴

Los aceites esenciales han demostrado poseer una alta efectividad antibacteriana sobre patógenos resistentes, ya que presentan un elevado porcentaje de compuestos fenólicos (eugenol), estos causan la alteración de la membrana.²⁴

III. Hipótesis

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 90 % tiene mayor efecto antibacteriano, in vitro, que el 50 % y 70% sobre *S. mutans* ATCC 25175.

IV. Metodología

4.1. Diseño de la investigación

La presente investigación es de tipo experimental, porque requiere la manipulación de una o más variables independientes.²⁵ En el estudio se manipuló el aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.

Es transversal, porque se realizó la recolección de datos en un tiempo único.²⁵ En el estudio se realizó la medición de halos de inhibición una sola vez después de 48 horas

Es prospectivo, porque analiza las posibles causas a través del tiempo en una población hasta la aparición del efecto ²⁵ En el estudio se evaluó las causas del efecto antibacteriano del *S. aromaticum*

4.2. Población y Muestra

- **Población:**

Cepa estandar de *S. mutans* ATCC 25175 del laboratorio GenLab.

- **Criterios de inclusión:**

Placas Petri con cepas de *S. mutans* ATCC 25175.

- **Criterios de exclusión:**

Fueron excluidos aquellos halos de inhibición no muy claros, o placas Petri con *S. mutans* con signos de contaminación microbiana.

- **Muestra**

Se seleccionó el tamaño de la muestra mediante un muestreo probabilístico

aleatorio simple, seguidamente se realizó una prueba piloto para evaluar el efecto antibacteriano.

El tamaño de la muestra se determinó usando la fórmula que corresponde a la comparación de medias de Dawson.²⁶

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Dónde:

n = Número de placas Petri por tipo de aplicación y concentración

$Z_{\alpha/2}$ = 1.645 Valor Z al 10% de error tipo I

Z_{β} = 1.645 Valor Z al 5% de error tipo II

μ_1 = Promedio de halos de inhibición de *Streptococcus mutans* con *Syzygium aromaticum* en aceite esencial

μ_2 = Promedio de halos de inhibición de *Streptococcus mutans* con *Syzygium aromaticum* en aceite esencial

σ = Desviación estándar de halos de inhibición de *Streptococcus mutans* con *Syzygium aromaticum* en aceite esencial

$$\sigma/(\mu_1 - \mu_2) = 0.675$$

Reemplazando se tiene:

$$n = 2 * (1.645 + 1.645)^2 * 0.675^2$$

n = 10 placas Petri/tipo de aplicación y concentración.

4.3 Definición y operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Tipo de variable	Escala de medida	Valor final
Variable Independiente Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i>	EL <i>Syzygium aromaticum</i> es una especie nativo de Indonesia, y son generalmente utilizados en el arte culinario. ⁸ Así como también ha sido utilizada en la medicina natural, incluyendo en enfermedades dentales. ²⁷	Aceite esencial en sus diferentes concentraciones : 50 %, 70 %, 90 %.	Concentraciones del aceite esencial.	Cualitativa	Ordinal	50 % 70 % 90%
Variable dependiente Efecto antibacteriano sobre <i>Streptococcus mutans</i>	Bacteria esférica Gram positiva del género <i>Streptococcus</i> ²⁸ . Se encuentra relacionada con la caries dental ^{29,30}	El método de Kirby-Bauer es un método de difusión. Se han desarrollado estándares para su interpretación y se encuentra apoyado por datos	Halos de inhibición	Cuantitativa	Razón	mm

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

4.4.1. Técnica:

La técnica empleada fue la observación microbiológica.

4.4.2. Instrumento:

Se utilizó como instrumento para medir los halos de inhibición, una regla de precisión milimétrica Vogel con DIN/ISO 866/I. El cual se encuentra validado ya que mide longitud y su calibración es confiable.

La ejecución se llevó a cabo con personal capacitado, se firmó una constancia de asesoramiento al investigador. (Ver anexo 1)

Los resultados fueron colocados en una ficha de recolección de datos. Posteriormente estos datos se colocaron en tablas estadísticas luego de haberse obtenido los respectivos resultados. (Ver anexo 2)

4.4.3 Para la Obtención del aceite esencial:

A) Obtención de las muestras vegetales:

Los botones florales de clavo de olor, fueron recolectados del distrito de San Pedro de Lloc, ubicada a 43 m.s.n.m., provincia de Pacasmayo, región La Libertad, durante el mes de Septiembre. Un ejemplar completo fue llevado al Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación taxonómica.⁴ (Ver anexo 3)

B) Extracción del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)

El material vegetal fue transportado al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, en donde se eliminó las sustancias extrañas presentes en la

muestra y luego secó a temperatura ambiente. ⁴

La obtención del aceite se realizó por el método de “destilación por arrastre de vapor de agua” (convencional) el cual permitió un buen rendimiento.⁴

El aceite esencial fue extraído a partir de los botones florales desecados, los cuales se colocaron en un destilador de acero inoxidable y se sometió a una corriente de vapor de agua sobrecalentada; de esta manera se arrastró la esencia que posteriormente por acción del refrigerante, fue condensada. El destilado se separó tomando en cuenta sus propiedades: Inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación de vidrio, se deshidrató las impurezas de agua en el aceite esencial con Na₂SO₄ anhidro, se filtró, guardándose en un frasco de vidrio color ámbar (para evitar la descomposición por la luz) y bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C. ^{4, 8}

C) Preparación de las diferentes concentraciones

Se tomó el aceite esencial puro (100%), volúmenes de 0.1, 0.25, 0.5 mL y, se colocaron en una fiola de 10 mL. Luego se completaron a volumen de 10 mL con Tween 80, obteniendo las concentraciones de 1, 2.5 y 5 % (v/v) respectivamente.^{7, 19} A partir del aceite esencial obtenido se prepararon las concentraciones de 50%, 70%, 90% respectivamente.^{7, 19}

Posteriormente, se colocaron cada concentración en frascos de color ámbar, para protegerlas de la luz. Las diluciones se guardaron a 4°C para el estudio microbiológico.^{4,8}

4.4.4 Evaluación del efecto, in vitro, de tres concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

A) Obtención de la cepa:

Este estudio utilizó un cultivo liofilizado de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, el cual se obtuvo del Laboratorio GENLAB. (Ver anexo 4)

B) Reactivación de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175.

La reactivación se realizó sembrando el cultivo liofilizado en tubo con 5 mL de Caldo Brain Heart Infusion (BHI) o Cerebro Corazón Infusión, luego se incubó a 37°C por 24 – 48 horas en condiciones de microaerofilia.⁴

Para evaluar pureza se sembró por estría en Agar TSYB e incubó a 37°C por 48 horas en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se eligió una colonia compatible con *Streptococcus* para realizar coloración gram.²⁹

A partir de una colonia se sembró en caldo BHI y en Agar Tripticasa Soya (TSA), y se conservó hasta su posterior empleo.³¹

4.4.5 Evaluación del efecto antibacteriano mediante el método de Kirby Bauer.

La evaluación del efecto antibacteriano, se realizó mediante el método Kirby Bauer, de difusión en agar.³¹

Para lo cual se procedió de la siguiente manera:

1. Estandarización del inóculo de *S. mutans* ATCC 25175.

La cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 mantenida en Caldo BHI se sembró en Agar TSA, se incubó bajo condiciones de microanaerobiosis a 37°C durante 24 horas. Luego de 24 horas de 3 a 4 colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 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 x 10⁸ ufc/mL)³¹

2. Inoculación de las placas.

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (1.5 x10⁸ ufc/ml), se tomó una alícuota de 100µl y se colocó en cada una de las placas con Agar Müeller Hinton, con un hisopo estéril sumergido en la suspensión se distribuyó la suspensión bacteriana en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo en la placa. Se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.³¹

3. Preparación de los discos con las concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum*.

Se prepararon discos de papel filtro whatman número 3 y se esterilizaron, luego fueron embebidos con 30 ul de cada una de las concentraciones de 50%, 70% y 90% del aceite esencial.

Luego, con una pinza estéril, se colocaron los discos sobre las placas de Mueller Hinton (AMHG) inoculadas con la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.³¹

Se empleó como control positivo Gluconato de clorhexidina al 0.12% y como control negativo etanol al 70%.³¹

4. Incubación:

Se incubaron las placas en posición invertida dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos, a 37°C durante 48 horas en microanaerobiosis utilizando jarra Gaspak y con el método de la vela.²⁹

5. Lectura de los resultados

Después del tiempo de incubación, a 48 horas se examinó cada placa se midieron los halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco para lo cual se utilizó un vernier.³¹

Se realizaron 10 repeticiones de cada ensayo.

4.5. Plan de análisis

Los datos recolectados fueron incorporados en una base de datos en IBM SPSS Statistics²³, para ser procesados y presentados en tablas con medias y desviaciones estándar para la efectividad del *Syzygium aromaticum* frente al *Streptococcus mutans*.

La efectividad del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* fue comparada empleando el análisis de ANOVA previo análisis de la normalidad de distribución de los valores y el test de Tukey para comparación entre ambos tratamientos en sus distintas concentraciones.

La significancia estadística fue considerada si $p < 0.05$. (Ver anexo 5)

4.6 Matriz de consistencia

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	METODOLOGÍA	POBLACIÓN
<p>Problema general: ¿Cuál es el efecto antibacteriano, in vitro, del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175?</p>	<p>Objetivo General: Comparar, <i>in vitro</i> el efecto antibacteriano de tres concentraciones del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Objetivos Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar, <i>in vitro</i>, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 50 % sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. • Evaluar, <i>in vitro</i>, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 70 % sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. • Evaluar, <i>in vitro</i>, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 90 % sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175. • Comparar, <i>in vitro</i>, el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 	<p>El aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 90 % tiene mayor efecto antibacteriano que el 50 % y 70 %.</p>	<p>Tipo de investigación: Cuantitativa.</p> <p>Nivel de investigación: La presente investigación es de nivel explicativo.</p> <p>Diseño de la investigación: El diseño del proyecto de investigación es prospectivo, transversal, analítico y experimental.</p>	<p>Población: Cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175</p> <p>Muestra: 10 repeticiones.</p>

50 % y digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

- Comparar, *in vitro*, el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 70 % y digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
 - Comparar, *in vitro*, el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 90 % y digluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
-

4.7. Principios éticos

El presente proyecto de investigación *in vitro*, se sometió a todos los principios éticos consignados en el código de ética de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote.

V. Resultados

5.1 Resultados

Tabla 1. Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* a las concentraciones de 50%, 70%, y 90%, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Concentración	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		p*
				Límite inferior	Límite superior	
50%	10	24.20	2.39	22.49	25.91	0.000
70%	10	28.40	2.46	26.64	30.16	
90%	10	31.80	4.26	28.75	34.85	
C+	10	21.80	2.20	20.22	23.37	
C-	10	.0	.0	.0	.0	

Fuente: Datos proporcionados por el autor.

p*: prueba ANOVA

Nivel de significancia estadística ($p < 0.05$)

Se utilizó la prueba ANOVA y se obtuvo $p = 0.000 < (0.05)$, el cual al ser menor que 0.05 indica que existe diferencia estadística significativa entre los tres tipos de concentración de 50%, 70%, y 90% y los controles positivo y negativo.

Tabla 2. Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* a las concentraciones de 50%, 70%, y 90% y los controles positivo y negativo, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

	(I) Porcentaje	(J) Porcentaje	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	50%	70%	0,008*	-75,524	-0,8476
		90%	0,000*	-109,524	-42,476
		C+	0,267	-0,9524	57,524
		C-	0,000*	208,476	275,524
	70%	50%	0,008*	0,8476	75,524
		90%	0,045*	-67,524	-0,0476
		C+	0,000*	32,476	99,524
		C-	0,000*	250,476	317,524
	90%	50%	0,000*	42,476	109,524
		70%	0,045*	0,0476	67,524
		C+	0,000*	66,476	133,524
		C-	0,000*	284,476	351,524
	C+	50%	0,267	-57,524	0,9524
		70%	0,000*	-99,524	-32,476
		90%	0,000*	-133,524	-66,476
		C-	0,000*	184,476	251,524
	C-	50%	0,000*	-275,524	-208,476
		70%	0,000*	-317,524	-250,476
		90%	0,000*	-351,524	-284,476
		C+	0,000*	-251,524	-184,476

Fuente: Datos proporcionados por el autor.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Al comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* a las concentraciones de 50%, 70%, y 90% y los controles positivo y negativo, frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Para la prueba Post hoc, test de Tukey, se obtuvo $p=0.000 < (0.05)$, el cual al ser menor que 0.05 indica que si existe diferencia estadística significativa entre todas las

comparaciones de las concentración de 50%, 70%, 90% y los controles positivo y negativo; a excepción de la comparación del 50% con el control positivo (C+) donde se obtuvo una significación de $p=0.267 > (0.05)$, el cual nos indica que no existe diferencia entre dicha comparación de concentraciones.

5.2. Análisis de resultados

El estudio de investigación demostró que el aceite esencial en sus concentraciones de 90%, 70% y 50%, posee efecto antibacteriano sobre el *Streptococcus mutans*, siendo respaldado por Sánchez et al.⁸ quienes evaluaron la efectividad antibacteriana de *Syzygium aromaticum* en forma de aceite esencial tomando muestras de *S. mutans* de piezas dentales cariadas.⁸

El presente estudio encontró que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 90 % causó mayor sensibilidad a *S. mutans* a diferencia del 50% y 70 % de aceite esencial, lo que puede deberse a los distintos componentes de *Syzygium aromaticum* entre los cuales tenemos sesquiterpenos, esteroides, eugenol, fenoles, óxidos, entre otros componentes minoritarios, flavonoides, esteroides, ácidos fenoles, triterpenos, ácido eugénico o cariofílico; entre otros, los cuales en su conjunto son los causantes de la sensibilidad del *S. mutans*.^{3,8}

Al realizar las diversas comparaciones entre las concentraciones de 50%, 70% y 90% de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* logró demostrar que existe diferencia significativa entre las tres concentraciones sobre *S. mutans*, sin embargo, en el estudio realizado por Diaz OV⁵, las concentraciones de 50%, 75% y 100%, presentan una diferencia mínima, lo cual podría deberse a diversos factores, ya que la composición química y por ende la calidad de los aceites esenciales pueden verse afectados, por la procedencia, el cuidado, y el tiempo de cosecha, para elaborar el aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, obteniendo así diferencias en los resultados.²⁴

El presente estudio también demostró que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* posee un mayor efecto antibacteriano en la concentración del 90%, formando un halo de inhibición de hasta 31.8 mm, a diferencia de las concentraciones de 70% y 50%, que llegaron a formar un halo de inhibición de 28,4 mm y 24,2 mm respectivamente, lo cual podría deberse a que el 90% posee una mayor cantidad de compuestos fenólicos (eugenol) ,a diferencia de las concentraciones de 70% y 50%, ya que estos elementos fenólicos tienen la capacidad de causar alteraciones bacterianas. Es importante mencionar que el eugenol se encuentra representado por un 70%-90% de la totalidad del aceite esencial.^{3, 8}

Se realizaron comparaciones del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* en concentraciones de 50%, 70% y 90% frente a Digluconato de Clorhexidina al 0.12% y Etanol a 70°, siendo éstos el control positivo y negativo, respectivamente, observando así que la concentración del 50% presentó diferencia significativa con Etanol 70°, mientras que con Digluconato de Clorhexidina al 0.12% no se obtuvo diferencia estadística significativa, lo cual podría deberse a su amplio espectro de actividad antibacteriana del Digluconato de clorhexidina.²⁰ Sin embargo en las concentraciones de 70% y 90% de aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, presenta diferencia significativa tanto con Digluconato de Clorhexidina al 0.12% y Etanol a 70°. Romero et al²⁰, nos mencionan a Digluconato de Clorhexidina como un potente antiséptico con gran sustentividad, amplio espectro de actividad bacteriana, de uso odontológico siendo susceptibles a éste, varios gérmenes de la mucosa bucal: *Streptococos*, *Stafilococos*, *Cándida albicans*, y bacterias anaeróbicas, entre otros.

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* presenta entre sus componentes:

sesquiterpenos, esterés, eugenol, entre otros componentes, los cuales en su conjunto pueden ser los causantes de la superioridad antibacteriana del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre *S. mutans*.

VI. Conclusiones

- El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 90% presentó un mayor efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, en comparación a las concentraciones de 50% y 70%.
- El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 50%, 70% y 90% presenta efecto antibacteriano con halos de inhibición promedio de 24.20 mm, 28.40 mm y 31.80 mm, respectivamente, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* al 50% presentó mayor efecto antibacteriano en comparación al Etanol 70%, e igual efecto que el Digluconato de Clorhexidina al 0.012%, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a diferencia del 70% y 90% que presentaron mayor efecto antibacteriano que Digluconato de Clorhexidina al 0.012%, y Etanol 70% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Aspectos complementarios

Se recomienda realizar más estudios de *Syzygium aromaticum* en diversas concentraciones, así como también otros en los que se pueda tomar la CMI y CMB, finalmente se recomienda elaborar investigaciones en los que se evalúe el efecto sinérgico entre aceites esenciales de diversas plantas.

Referencias bibliográficas

1. Lamas O. Estudio de la colonización por *Streptococcus mutans* y hábitos dietéticos durante la lactancia y primera infancia. [Tesis doctoral] Madrid. Universidad Complutense de Madrid, [Citado el 19 de Febrero de 2018]; 2003. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/odo/ucm-t26656.pdf>
2. Avello M, Cisternas F. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile [internet]. Rev Med Chile [Serie en Internet]2010, Jun.[Citado el 19 de Febrero del 2018]; 138: 1288-1293.Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rmc/v138n10/art%2014.pdf>
3. Aguilar G, López Malo. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. Universidad de las Américas Puebla. [Serie en Internet] 2013 [Citado el 19 de febrero de 2018] 7(2) 35-41. Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Aguilar-Gonzalez-et-al-2013.pdf>
4. Panrea C. Manual Básico de Microbiología. 4 ed. Barcelona. Cultimed; 2003.
5. Díaz OV. Efecto inhibitor del aceite esencial del clavo de olor *Syzygium aromaticum* como agente antimicrobiano sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]. Quito. Universidad central de Ecuador. 2016. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7375/1/T-UCE-0015-380.pdf>
6. Gamboa J, Vásquez M. Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. Revista Rebiolest [serie en Internet] 2015 [citado el 21 de Enero de 2019] 1(3) 42-51. Disponible: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/894/823>
7. Rodríguez O, Sánchez R, Verde M, Núñez M, Ríos R, Chávez A. Obtaining of the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*.Journal of Oral Research [Serie en internet] 2014

- [Citado el 19 de Febrero del 2018]; 3(4): 218-224. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/273295758> Obtaining of the essential oil of *Syzygium aromaticum* identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*
8. Sánchez LK, Galdámez J, Linares A, García Y. Actividad cariosa y efectividad antimicrobiana del Aloe Vera y *Syzygium aromaticum* sobre *Streptococcus mutans*, aislado de la cavidad oral. Recopilación de artículos científicos del Congreso de Investigaciones 2015 [Serie en Internet] 2016, Jun. [Citado el 19 de Febrero de 2018] 1(1): 79-88 .Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/292981687> Actividad cariosa y efectividad antimicrobiana del Aloe vera y *Syzygium aromaticum* sobre el *Streptococcus mutans* aislado de la cavidad oral
 9. Sethi S, Dutta A, Gupta B, Gupta S. Antimicrobial activity of spices against isolated food borne pathogens. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. [Serie en internet] 2012, Nov. [Citado el 19 de Febrero del 2018]. 5 (1): 260-262.Disponible en: <http://www.ijppsjournal.com/Vol5Issue1/6215.pdf>
 10. Rana I, Rana A, Rajak R. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. Brazilian Journal of Microbiology. [Serie en internet]. 2011, Dec. [Citado el 19 de Febrero del 2018] 42(4): 1269–1277. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3768706/>
 11. Gupta C, Garg A, Uniyal R, Gupta S. Comparison Of Antimicrobial Activities Of Clove Oil & Its Extract On Some Food Borne Microbes. The Internet Journal of Microbiology [Serie en internet]. 2008 [Citado el 19 de Febrero 2018] 7(1):7.Disponible en: <http://ispub.com/IJMB/7/1/13649>
 12. Pedro D, García L. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas [serie en internet] 2010, Jun [citado el 21 de Enero de 2019] 9(2): 156-166. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-

519X2010000200004

13. Miguelañez B, Pastor M, Sarría B. Estado actual de la etiología de la caries dental. Foros de Patología de la Universidad Rey Juan Carlos. [serie en Internet] 2007. [citado el 21 de Enero de 2019] 10 (1): 1-10. Disponible en: http://biopat.cs.urjc.es/conganat/files/2006-2007_G13.pdf
14. Iguarán I. Factores biológicos asociados a la caries dental. [Tesis para optar el título de cirujano dentista]Guayaquil. Universidad de Guayaquil. 2012. Disponible en:<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/2766/1/FACTORES%20BIOLOGICOS%20ASOCIADOS%20A%20LA%20CARIES%20DENTAL.pdf>
15. Organización Mundial de la salud. España [página en internet] Salud bucodental, c2012
16. Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., y Skalniak, The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology. [serie en internet] 2013 Oct [citado el 21 de Enero de 2019] 33(4), 499-515. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3953549/>
17. Scottish Intercollegiate Guidelines Network. Dental interventions to prevent caries in children. Edinburgh: SIGN; 2014, 52(138): 1-45Disponible en: <http://www.sign.ac.uk>
18. Ojeda C, Oviedo E, Salas A, Streptococcus mutans y caries dental. Revista CES Odontología [Serie en internet] 2013, Jun. [citado el 18 de Febrero del 2018]; 26(1): 44-56. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
19. Pedraza D, Hernández Y. Diseño y valoración para un medio de cultivo de selectivo (sulvac) para St. Mutans. [Tesis para optar el título de bacteriólogo]. Bogota. Pontificia Universidad Javeriana de Ciencias. [Serie en Internet] 2006 [Citado el 19 de febrero del 2018]. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8821/1/tesis162.pdf>

20. Junco P, Baca P. Odontología Preventiva y Comunitaria: Principios, métodos y aplicaciones. Métodos de control de la placa bacteriana. Cuenca- Baca eds. [serie en internet] 2005 [citado el 19 de Febrero del 2018]; 3(1) 64-69. Disponible en: <http://www.ugr.es/~pbaca/p4controlquimicodebiopelículasorales/02e60099f4106531c/prac04.pdf>
21. Romero M, Papone V, Jiménez C. Gluconato de clorhexidina: seguridad y eficacia como antiséptico en cirugía bucomáxilofacial. Tendencia en medicina. [serie en internet] 2016, Mayo. [Citado el 19 de Febrero del 2018]; 48(1)113-12. Disponible en: http://tendenciasenmedicina.com/Imagenes/imagenes48/art_16.pdf
22. Torres L, Díaz A, Acosta M. La clorhexidina, bases estructurales y aplicación en estomatología. Gaceta Medica Espirituana [serie en internet] 2009, [Citado el 13 de Julio del 2018]; 11(1). Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.11.%281%29_08/p8.html
23. García VA. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre la caracterización y vida útil de tomates (*Solanum lycopersicum*) frescos. [Tesis para optar el título de Ingeniero agroindustrial e industrias alimentarias] Piura. Universidad Nacional de Piura. [Serie en internet] 2006 [Citado el 14 de Febrero del 2019] Disponible en: <http://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/661/IND-GAR-VILL-16.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
24. Hernández SP. Encapsulación de Aceite de clavo para su aplicación en la industria alimentaria. [Tesis para optar el título de doctor]. Murcia. Universidad Católica de San Antonio [Serie en internet] 2011 [Citado el 14 de febrero del 2019]. Disponible en: <http://repositorio.ucam.edu/bitstream/handle/10952/260/Tesis%20Pilar%20Hern%C3%A1ndez.pdf?sequence=1>
25. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 5 ed. México, McGraw-Hill-Interamericana Editores, 2010.
26. Dawson B, Trapp G. Bioestadística Médica. 4da ed. México: Editorial Manual

Moderno; 2005.

27. Pulikottil S, Nath S. Potential of clove of *Syzygium aromaticum* in development of a therapeutic agent for periodontal disease. A review. [Internet] Revista Scielo. [Serie en internet] 2015, Abril. [Citado el 13 de Julio del 2018];70(3): 108-115.Disponible en: <http://www.scielo.org.za/pdf/sadj/v70n3/10.pdf>
28. Universidad Nacional Autónoma de México. Diccionario de microbiología y parasitología. 1ed. México.2011.Streptococcus; p.
29. Aguilera L, Sánchez C, Neri C, Aceves M. Streptococcus mutans en saliva y su relación con caries dental. [Internet] Revista ADM. [Serie en internet] 2009, Noviembre. [Citado el 13 de Julio del 2018]; 65(6): 48- 56.Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2009/od096h.pdf>
30. Bojanich A, Calamari S, Cornejo L, Barembaum S, Virga C, Dorronsoro S. Efecto de polímero sobre los niveles de IgAs anti Streptococcus mutans y la producción de dextranos de Streptococcus mutans autóctonos (estudio in vitro e in vivo). [Internet] Revista Scielo. [Serie en internet] 2003, Mayo [Citado el 13 de Julio del 2018]; 19(5): 225-232.Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/odonto/v19n5/original2.pdf>
31. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty third Information Supplement. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

ANEXOS

Anexo 1

CONSTANCIA

Yo, Manuela Natividad Luján Velásquez, Biólogo – Microbiólogo docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo, con registro del CBP N° 2132.

Mediante la presente dejo constancia de haber colaborado con la alumna SÁNCHEZ ARÉVALO KELLY, estudiante de la Facultad de Odontología de la Universidad Los Angeles de Chimbote con DNI 47333726, en la ejecución de la parte microbiológica planteada en el proyecto de investigación titulado: **"EFECTO ANTIBACTERIANO, IN VITRO, DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* SOBRE *Streptococcus mutans* – ATCC 25175"**


Manuela Natividad Luján Velásquez

Docente de la Escuela de Microbiología y Parasitología
Universidad Nacional de Trujillo.

Dra. Manuela Natividad Luján Velásquez
CATEDRA DE INMUNOLOGIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO



Trujillo, 16 de enero del 2017

CONSTANCIA DE ASESORÍA

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 y acreditada como Docente Investigadora por CONCYTEC con número de registro REGINA: N°1582.

Dejo constancia de haber asesorado al alumna **KELLY LISSETTE SANCHEZ AREVALO** en las actividades de recolección del material vegetal, preparación de la muestra, extracción de aceite esencial y preparación de las concentraciones de ensayo, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de La Universidad Nacional de Trujillo. Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas, serán utilizadas para el desarrollo de la tesis titulada: "Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Syzygium Aromaticum* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175".

Atentamente,



Dra. **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**
Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Laboratorio de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo

Anexo 2

Ficha de recolección de datos

Medidas de halos de inhibición					
Concentración	Halos de inhibición (mm)				
	50%	70%	90%	Control +	Control -
Repeticiones					
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Anexo 3

DESGLOSABLE
Apellidos y Nombres: Sánchez Cerevebo Kelly DNI 47333726
Objeto de la Solicitud: (Indicar en forma clara lo que solicita y detallar documentos que adjunta)
Determinación taxonómica de la planta.
Familia: MYRTACEAE
N. C. : Syzygium aromaticum (L.) Merr. & L. M. Perry

N° Procedimiento del TUPA : 142

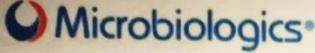
88-150-1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD U OFICINA Herbario HUT
FECHA 19/09/2016 HORA 7:25 pm
RECEPCIONISTA: Eric F. Rodríguez
AUTOMATICO S.A. (+) S.A. (-)
PLAZO ATENCIÓN (Segun TUPA): 07 días háb.
REGISTRO _____ FIRMA _____

Atenc.

DISTRIBUCIÓN GRATUITA

Anexo 4



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

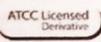
<p>Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-23 Reference Number: ATCC® 25175™ Purity: > 99.9% of Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 3</p>	<p>Expiration Date: 2018/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2016/12/8</p>
<p>Macroscopic Features: Two colony types; small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.</p> <p>Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains</p>	<p style="text-align: center;">Performance</p> <p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: Vitek GP (1) See attached ID System results document.</p>	<p>Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative</p> <div style="text-align: center;">  Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE </div>

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005


ACCREDITED
 TESTING CERT #2655.01

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303 Page 1 of 1 DOC-266

Anexo 5

Valores obtenidos en la medición de halos de inhibición

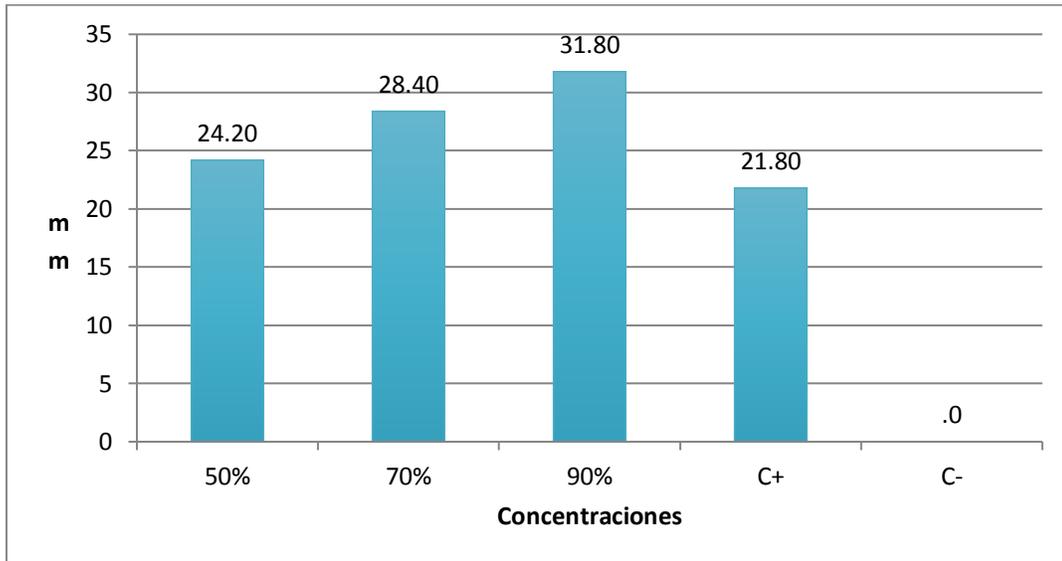
Concentración Repeticiones	Halos de inhibición mm				
	50%	70%	90%	C+	C-
1.	24	27	28	18	0
2.	28	30	35	20	0
3.	22	28	30	24	0
4.	25	28	30	22	0
5.	22	27	30	20	0
6.	25	28	31	22	0
7.	24	28	34	20	0
8.	20	24	25	24	0
9.	25	30	40	24	0
10.	27	31	35	24	0

Prueba de normalidad

Grupos	Shapiro-Wilk			Distribución Normal
	Estadístico	gl	Sig.	
50%	0,961	10	0,793	Normalidad
70%	0,913	10	0,305	Normalidad
90%	0,957	10	0,749	Normalidad
C+	0,855	10	0,067	Normalidad

Al tener menos de 50 datos por cada concentración, es recomendable usar la prueba de normalidad del Shapiro- Wilk, para evaluar la distribución normal de los datos, de donde se puede observar que los valores obtenidos en 50%, 70%, 90% y C+, con una significancia mayor a 0.05 (Sig. >0.05), Con lo cual podemos concluir que los datos si presentan un distribución normal.

Anexo 6

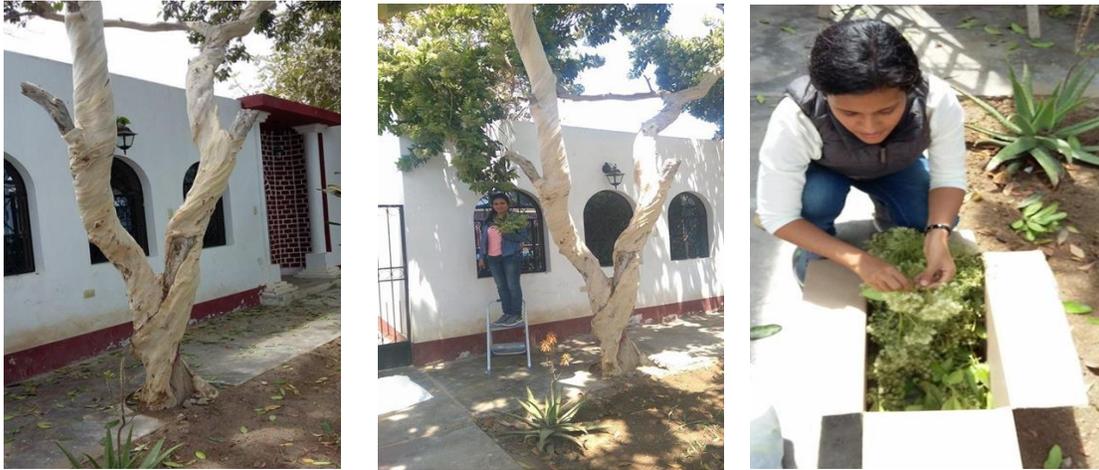


Fuente: Datos proporcionados por el autor.

Gráfico 1 *Comparación del efecto antibacteriano del aceite esencial de Syzygium aromaticum a las concentraciones de 50%, 70%, y 90% y los controles positivo y negativo, frente a Streptococcus mutans ATCC 25175.*

Anexos

Collage de Fotos



Recolección de *Syzygium aromaticum*



Secado a temperatura ambiente y selección de botones de *Syzygium aromaticum*



Obtención de *Syzygium aromaticum* por el método de destilación por arrastre de vapor de agua



Obtención del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* en concentraciones 50%, 70% y 90%



Obtención y reactivación de la cepa de *S. mutans*



Inoculación de las placas y preparación de los discos



Placas Petri con concentraciones del 50% 70% y 90%, de *Syzygium aromaticum*