

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
CHIMBOTE

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

**EFEECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE
ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (CLAVO DE OLOR)
SOBRE CEPA DE *Streptococcus mutans* sp.**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTORA:

ANA ELIZABET RODRÍGUEZ SALINAS

ASESOR:

Mgtr. CÉSAR LEAL ALFREDO VERA

TRUJILLO – PERÚ

2018

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Q.F. Jorge Luis Díaz Ortega.

Presidente

Mgtr. Q.F. Nilda María Arteaga Sevilla

Miembro

Mgtr. Q.F. Luisa Olivia Amaya Lau.

Miembro

Mgtr. Q.F. César Alfredo Leal Vera.

Docente Tutor Investigador

AGRADECIMIENTO

Al primer ser quien ha forjado mi camino y me ayudado a caminar por el sendero correcto, a Dios, el ser maravilloso el que en todo momento está conmigo guiando mi vida y cuidando cada paso que doy. Él es quien guía el destino de mi vida.

A mis padres que son el cimiento de mi desarrollo, y que gracias a sus consejos me han ayudado a luchar por mis sueños, gracias por enseñarme valores que me han llevado a crecer como persona y a alcanzar mis metas. Los quiero mucho.

Expreso gratitud a mis docentes de la ULADECH, y en especial a los docentes José Aponte Gutiérrez por sus conocimientos brindados durante la realización de mi tesis y a mi asesor César Leal Vera por su asesoramiento.

A ti, tu ayuda ha sido fundamental, no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación se los dedico con todo mi amor a mis amados padres porque son mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más, que con sus palabras de aliento me brindaron fortaleza para no decaer y siempre ser perseverante y cumpla mis metas propuestas.

A mis hermanos, que pusieron su confianza en mí, su ayuda ha sido sumamente importante, estuvieron a mi lado inclusive en los momentos y situaciones más difíciles, siempre ayudándome a lograr mis sueños.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación de diseño experimental, se realizó con el objetivo de comprobar el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), en cultivo de *Streptococcus mutans* sp. ATCC®25175. Se sembró la cepa de *Streptococcus mutans* sp. en placas Petri y se agregó el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), a concentraciones de 10%; 15%; 25%; 50%; y 100% observándose promedios y desviación estándar para los halos de inhibición correspondiente de 3.63 ± 1.41 mm; 8.36 ± 1.59 mm; 16.25 ± 3.41 mm; 27.5 ± 4.84 mm; 62.13 ± 2.10 mm; respectivamente. Se concluyó que el nivel de significancia es $p= 0.000$ la cual es menor a $p<0.05$, con lo que se demuestra que existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones. La explicación de la acción antibacteriana es porque el aceite esencial de la planta estudiada, contiene compuestos fenólicos que actúan a nivel de proteínas y fosfolípidos de la membrana celular de la bacteria es por eso que produce la muerte del microorganismo.

PALABRAS CLAVES: Planta medicinal, Aceite esencial, *Syzygium aromaticum*, efecto antibacteriano, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

The present experimental design research work was carried out in order to verify the in vitro antibacterial effect of the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove), in culture of *Streptococcus mutans* sp. ATCC®25175. The strain of *Streptococcus mutans* sp was seeded in Petri dishes and the essential oil of *Syzygium aromaticum* (clove) was added at concentrations of 10%; fifteen%; 25%; fifty%; and 100%, observing averages and standard deviation for the corresponding inhibition zones of 3.63 ± 1.41 mm; 8.36 ± 1.59 mm; 16.25 ± 3.41 mm; 27.5 ± 4.84 mm; 62.13 ± 2.10 mm respectively. It was concluded that the level of significance is $p = 0.000$ which is less than $p < 0.05$, which shows that there is a significant difference between the different concentrations. The explanation of the antibacterial action is because the essential oil of the plant studied, contains phenolic compounds that act at the level of proteins and phospholipids of the cell membrane of the bacteria that is why it produces the death of the microorganism.

KEY WORDS: Medicinal plant, Essential oil, *Syzygium aromaticum*, antibacterial effect, *Streptococcus mutans*.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
I. INTRODUCCIÓN	01
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	06
2.1 Antecedentes.....	06
2.2 Bases Teóricas	10
III. HIPÓTESIS	28
IV. METODOLOGÍA	29
4.1 Diseño de investigación.....	29
4.2 Población y muestra.....	29
4.3 Definición y Operacionalización de variables.....	31
4.4 Técnicas e instrumentos.....	32
4.5 Plan de análisis.....	34
4.6 Matriz de consistencia.....	35
4.7 Principios éticos.....	36
V. RESULTADOS	37
5.1 Análisis de resultados.....	38
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	41
6.1 Conclusiones.....	41
6.2 Recomendaciones.....	42
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
VIII. ANEXOS	51

CONTENIDO DE TABLAS

TABLA 1. Efecto inhibitorio sobre crecimiento de cepas de <i>Streptococcus mutans</i> Sp. según la concentración del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).	37
---	----

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura N° 01: Anexo de compra de medio de cultivo	51
Figura N° 02: Anexo de compra de microorganismo.....	52
Figura N° 03: Anexo de compra de aceite esencial.....	53
Figura N° 04: Certificación de origen de prueba de aceite esencial.....	54
Figura N° 05: Especificaciones de aceite esencial	55
Figura N° 06: Esquema de activación de la bacteria <i>Streptococcus mutans sp</i>	56
Figura N° 07: Esterilización del material a emplear en el proceso del trabajo de investigación	56
Figura N° 08: Esterilización del ambiente para sembrado de la bacteria <i>Streptococcus mutans sp</i>	57
Figura N° 09: Activación de la bacteria <i>Streptococcus mutans sp</i>	57
Figura N° 10: Sembrado de la bacteria <i>Streptococcus mutans sp</i>	58
Figura N° 11: Pasos para el crecimiento de la bacteria <i>Streptococcus mutans sp</i> ...	59

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han ocupado, desde los inicios de la medicina occidental, un lugar privilegiado como agentes terapéuticos. En el Corpus hippocraticum o colección de obras atribuidas a Hipócrates, que se remonta al siglo VI a.C. Se hace la clara distinción entre los agentes terapéuticos, o pharmakon, que son de origen animal, vegetal y mineral. Los de origen animal por su estrecha semejanza con la naturaleza del cuerpo humano tendrían un efecto muy fuerte o agresivo, mientras que los de origen mineral por su esencia tan distinta al ser humano tendrían poco efecto; en cambio, las plantas son seres vivos pero distintos a la naturaleza humana y por tanto son ideales para actuar sobre la enfermedad ⁽¹⁾.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), rescatar el conocimiento sobre el uso de plantas en la medicina tradicional es una alternativa para la atención primaria, sobre todo en los países en vías de desarrollo, no obstante, ha tenido que transcurrir mucho tiempo y algunos acontecimientos para que la medicina tradicional sea valorada. En 1977, la OMS hizo conocer su propuesta política “Salud Para Todos en el Año 2000”, que fue impulsada en la Conferencia de Alma Ata, en 1978, con la creación de la estrategia de Atención Primaria se Salud (APS), que incluye la participación de la comunidad, su saber médico tradicional y sus conocimientos sobre la utilización de las plantas medicinales ⁽²⁾.

En países en vías de desarrollo se ha descrito que hasta el 90% de la población usa la medicina tradicional. Estudios en Latinoamérica reportan diferentes frecuencias de uso de plantas medicinales ⁽³⁾. En el año 2007 se realizó una cumbre internacional organizada por el Colegio Médico del Perú, conocida como La Declaración de Lima,

la cual reconoce entre otros puntos la importancia de la medicina tradicional y recomienda su armonización y articulación con los sistemas de salud oficiales de cada país ⁽³⁾.

En el Perú, las plantas medicinales han sido de mucha importancia y se viene aprovechando su uso desde hace siglos. Durante muchos años, investigadores han estudiado las propiedades de diversas especies vegetales encontrando principios activos beneficiosos para muchas enfermedades. “El Perú es considerado el tercer país mega diverso del planeta, lo que implica, que en nuestro territorio existe un gran potencial de estudio de muchas especies vegetales, 50 000 para ser exactos, lo que constituye el 20% de las especies del planeta, de las que, 2 000 han sido utilizadas con fines curativos” ⁽⁴⁾.

Una de las plantas medicinales utilizadas con fines terapéuticos y aprobada por la OMS, con estudios científicos es el *Syzygium aromaticum*, (Clavo de Olor) es una especia ampliamente aprovechada en la perfumería y la medicina; dentro de la industria alimentaria, su aceite esencial es utilizado mayormente como saborizante. Existe mucha información acerca de las funciones antimicrobianas de este aceite esencial contra patógenos transmitidos por el consumo de alimentos e incluso, contra microorganismos resistentes a antibióticos y a anti- fúngicos” ⁽⁵⁾.

El Aceite de *Syzygium aromaticum*, (Clavo de Olor), se utiliza en estomatología humana por sus propiedades anestésicas y antisépticas. Marroquín indica que la actividad antimicrobiana del aceite de *Syzygium aromaticum*, (Clavo de Olor) se atribuye al eugenol, principio activo presente en un 99% en el aceite esencial. El eugenol por ser un compuesto fenólico, en altas concentraciones, tiene la capacidad

de degenerar las proteínas bacterianas y en bajas concentraciones las estabiliza; lo que previene la penetración bacteriana a tejidos duros y blando ⁽⁶⁾.

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente. Se describe la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, que se da por el metabolismo bacteriano en la superficie dentaria, que con el tiempo puede producirse una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad, 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. ⁽⁷⁾.

El concepto actual contempla que varios microorganismos se incluyen en la patogénesis de la caries dental (estreptococos del grupo *mutans*, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*) de los cuales, *Streptococcus mutans* es el agente más importante asociado a ella. La caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral. La complejidad de la enfermedad que conocemos como caries se debe a los múltiples factores que están asociados con la evolución de una población bacteriana que pasa de una biopelícula saludable a otra patológica ⁽⁷⁾.

Debido a que nuestro país posee una enorme variedad de plantas medicinales, y que muchas de ellas han sido utilizadas en la antigüedad solo con conocimientos empíricos, se da la necesidad de seguir investigando científicamente qué efectos terapéuticos nos pueden brindar estas plantas y así poder emplearlas en diversas enfermedades, por

ejemplo una de ellas y muy común es la caries dental que es una de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia en el ser humano, y continua manteniéndose como una de los principales problemas de salud bucal pública a nivel mundial.

El uso de plantas medicinales en caries dental constituye una alternativa viable y eficaz para prevenir y combatir esta patología, en este trabajo experimental se investigó, si el *Syzygium aromaticum*, (Clavo de Olor), posee una acción antibacteriana sobre *streptococcus mutans* causante de la caries dental. Muchas sustancias han sido ya descubiertas, pero, sin duda, queda un gran futuro donde se descubrirán nuevas estructuras y nuevas aplicaciones de estas sustancias naturales. De allí la importancia de la realización de este trabajo de investigación para dar a conocer la utilidad de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), como una buena alternativa para prevenir y controlar patologías dentales, asimismo crear productos afines a base de esta planta en mención como geles dentríficos, cremas tópicas y colutorios que ayudarán al control de caries dental.

Teniendo esta información y queriendo comprobar los efectos terapéuticos del *Syzygium aromaticum*, (clavo de olor), nos planteamos el siguiente problema:

¿Tendrá alguna acción antibacteriana in vitro, el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), sobre cepa de *Streptococcus Mutans sp.*?

OBJETIVOS

Objetivo General.

- Determinar el efecto antibacteriano que posee el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), sobre *Streptococcus mutans sp.* in vitro.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), a cinco diferentes concentraciones sobre *Streptococcus mutans sp.*
- Comparar el efecto antibacteriano de cinco diferentes concentraciones del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), sobre *Streptococcus mutans sp.*

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES:

De los Ángeles et al, ⁽⁸⁾ en el año 2011 en el Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad de la Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador, realizaron un estudio sobre la eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de “ishpingo” *ocotea quixos* y *syzygium aromaticum* (clavo de olor). Los resultados obtenidos fue que se observó ausencia de crecimiento en concentraciones del aceite esencial superiores a 0,78% para *S. pyogenes* y 0,13% para *Streptococcus mutans*, mientras que Listerine no es capaz de inhibir el crecimiento de *S. mutans* ni de *S. pyogenes*, ya que no se observa ningún halo de inhibición. El aceite esencial de clavo de olor utilizado para la elaboración del colutorio, presento una CMB para *Streptococcus mutans* de 0,26% y una CMB para *S. pyogenes* de 1,56%.

Conrado ⁽⁶⁾ en el año 2012 realizó un estudio en la universidad de San Carlos de (Guatemala), en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con la finalidad de evaluar el efecto bactericida del aceite de *syzygium aromaticum* (clavo de olor) en bacterias comúnmente aisladas en cavidad oral de perros. Los resultados que obtuvieron el aceite de *syzygium aromaticum* (clavo de olor), no inhibió del todo al crecimiento de esta bacteria, dando como resultado halos de inhibición menores a 15 mm y mayores a 5 mm de diámetro, pero recomiendan que a mayores concentraciones si puede haber una mayor inhibición del crecimiento bacteriano.

Díaz ⁽⁹⁾ en la Universidad Central del Ecuador Facultad de Odontología en Quito en el año 2016, realizó una investigación para evaluar el efecto de cuatro diferentes concentraciones como los son al 25%, 50%, 75% y 100% sobre cultivo de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Las cuales se incubaron a 35°C +/- 2 por 24 horas. Trascurrido el tiempo se visualizó, que los halos de inhibición alcanzaron un máximo de 22 mm de diámetro, comprobándose, que el aceite esencial de *syzygium aromaticum* (clavo de olor) si inhibe a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668.

Núñez et al, ⁽¹¹⁾. en la Universidad Señor de Sipan Lambayeque- Perú, en el año 2012 se realizó una investigación que tuvo como objetivo encontrar la concentración óptima de aceite esencial de hojas de *syzygium aromaticum* (clavo de olor) que permita conservar microbiológicamente la carne molida almacenada en refrigeración. Los parámetros microbiológicos evaluados fueron bacterias (mesófilos aerobios, coliformes totales) indicadoras de la calidad sanitaria de la carne (*E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) que pueden estar presentes en el producto. Los resultados obtenidos muestran que el aceite esencial de clavo de olor a 800 ppm, produjeron acción antimicrobiana total sobre coliformes totales, *Staphylococcus aureus*.

Cerga⁽¹⁰⁾ en el año 2015 en la Universidad Privada Norbert Wiener de Lima-Perú. Se realizó un estudio con el fin de determinar el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) y *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) en comparación con gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. Al realizar las pruebas de sensibilidad in vitro encontró que el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” en su concentración mínima efectiva (1%) fue mayor al efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) en su concentración mínima efectiva (25%). A su vez se observa un efecto antimicrobiano mayor del control positivo Gluconato de clorhexidina al 2 %.

Armas et al,⁽¹³⁾ en el año 2011 en la Universidad Privada Antenor Orrego, evaluó el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), canela y su combinación a diferentes concentraciones sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays* L.) variedad morado. Determinó el efecto significativo del aceite esencial de clavo de olor, canela y su combinación a las diferentes concentraciones sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus*. El aceite esencial de clavo de olor al 0,20% produjo la mayor acción fungistática sobre *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz morado durante 72 h a 28 °C.

Gamboa et al,⁽¹²⁾ en la universidad Nacional de Trujillo durante el año 2014, evaluó el efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* “clavo de olor” en la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. La extracción del aceite esencial (AE) se realizó a partir de brotes de clavo de olor usando el método de destilación por arrastre con vapor de agua. Se prepararon concentraciones

del aceite al 10%, 20%, 30% y 40% más Tween 80 como solvente emulsificante. El efecto del AE sobre los microorganismos se determinó por el método de difusión en agar utilizándose concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% de aceite. Se encontró una relación directa entre la concentración del aceite y el efecto inhibitorio: a mayor concentración (40%) mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio. Se concluye que el AE evaluado presenta un notable efecto inhibitorio en la supervivencia de *S. typhi*, *S. paratyphi A* y *B. cereus*.

2.2 BASES TEÓRICAS

Planta Medicinal:

Son aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tienden a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes ⁽¹⁴⁾.

Los remedios con plantas medicinales presentan como principal ventaja con relación a los medicamentos químicos que sus principios activos se hallan biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos negativos sean menores ⁽¹⁴⁾.

SYZYGIUM AROMATICUM. (CLAVO DE OLOR)

a) Clasificación Botánica:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Myrtales

Familia: Myrtaceae

Subfamilia: Myrtoideae

Género: *Syzygium*

Especie: *Syzygium aromaticum*

b) Características morfológicas y propiedades:

Syzygium aromaticum (clavo de olor) se trata de un árbol perenne, perteneciente a la familia de las Mirtáceas, caracterizado por presentar una altura cercana a los 15 metros; hojas simples, ovado – oblongas, lisas y brillantes de 5 – 12 cm de largo, la planta produce flores cada 2-3 años ⁽¹⁵⁾.

El clavo de olor ha sido utilizado como una importante especia a través del tiempo, también es empleado en el alivio sintomático del dolor de dientes y en problemas de dentición, los extractos de esta planta, tienen un uso en medicina debido a sus efectos de tipo anestésico, antiséptico, y antibacteriano ⁽¹⁶⁾.

Según la Real Farmacopea Española, la concentración del aceite esencial de la droga no debe ser inferior al 15%. El aceite esencial contenido en las hojas presenta una menor concentración (2%) siendo su principal constituyente el eugenol (82-88%). En la corteza llega al 4-6% y su tenor en eugenol es aún mayor: 90-95%. Este aceite tiene la particularidad de ser más pesado que el agua, es de color amarillo, tornando al parduzco en contacto con el aire ⁽¹⁷⁾.

Asimismo, también se ha identificado presencia de Fitoesteroles (β -sitosterol, estigmasterol, campesterol), taninos elágicos (10 -13%), ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido cratególico, ácido 18-dehidrourosólico, salicilato de metilo, flavonoides (derivados del quercetol y kempferol, eugenitina, ácido oleánico), aceite fijo, eugenina (cromona) ⁽¹⁷⁾.

c) Parte Utilizada

La droga está constituida por los botones florales o yemas sin abrir secas. En mucha menor medida se destilan las hojas. La droga presenta olor fuertemente aromático, con sabor característico y ardiente. Las plantas cultivadas presentan aroma más intenso. Comprimiendo el receptáculo entre la uña y el dedo se hace visible el aceite volátil. Los botones se recolectan cuando presentan coloración rojiza (al desecarlos tornase amarronados). Con el paso del tiempo la planta produce flores con alto contenido en aceite esencial, alcanzando el máximo cercano a los 20 años ⁽¹⁷⁾.

ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son productos caracterizados por un fuerte olor, constituidos por mezclas complejas de compuestos volátiles y obtenidos a partir de algún material natural mediante destilación (seca, con agua o vapor) o por expresión mecánica (para las frutas cítricas) ⁽¹⁸⁾.

La Farmacopea Europea define al aceite esencial como: “Un producto oloroso, usualmente de composición compleja, obtenido de un material de una planta definida botánicamente, mediante destilación con vapor, destilación seca o por algún proceso mecánico sin calor” (Farmacopea Europea, 2008). El Consejo de Europa describe al aceite esencial como un producto obtenido a partir de materiales vegetales ⁽¹⁸⁾.

a) Características Generales:

Los aceites esenciales, en general, constituyen del 0,1 al 1% del peso seco de la planta. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos. Cuando están frescos, a temperatura ambiente, son incoloros, ya que al oxidarse se resinifican y toman un color amarillento oscuro (lo que se previene depositándolos en recipientes de vidrio de color topacio, totalmente llenos y cerrados perfectamente). La mayoría de los aceites son menos densos que el agua (salvo excepciones como los aceites esenciales de canela, sazafrán y clavo) y con un alto índice de refracción ⁽¹⁹⁾.

En cuanto a su composición química, a excepción de las esencias derivadas de heterósidos (como la de las almendras amargas y mostaza), son generalmente mezclas complejas de constituyentes muy variables que pertenecen, de forma casi exclusiva, al grupo de los terpenos y, en menor medida, al grupo de los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (aldehído cinámico, eugenol, anetol, aldehído anísico y safrol, entre otros) ⁽¹⁹⁾.

b) Actividad Antimicrobiana:

El alto contenido en eugenol (o ácido cariofílico) le proporciona al aceite esencial propiedades antisépticas, bactericidas, parasiticidas y antimicóticas. En odontología, sus propiedades antisépticas y bactericidas hicieron que forme parte de numerosos preparados y enjuagues bucales, al demostrar actividad inhibitoria frente a gérmenes anaeróbicos Gram negativos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia*. Entre los componentes inhibitorios más potentes figuraron las flavonas kaempferol y miricetina ⁽¹⁷⁾.

c) Actividad Analgésica – Antiinflamatoria:

El aceite de clavo de olor tiene una larga historia de uso para el alivio del dolor dental, siendo muy útil su aplicación local en forma de pasta de relleno (junto al óxido de zinc) luego de una extracción dental. Estudios en ratones determinaron el efecto antiinflamatorio del extracto metanólico sobre edema de oreja de ratón inducido por acetato de tetradecanoilforbol. Al respecto, el eugenol demostró ser muy activo como inhibidor de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos, lo que resulta en un bloqueo de las vías metabólicas de las enzimas ciclooxigenasa y lipooxigenasa. El acetato de

eugenol evidenció poseer un mecanismo de acción similar al ácido salicílico, inhibiendo en forma irreversible a la enzima ciclooxigenasa por transferencia del grupo acetilo ⁽¹⁷⁾.

d) Mecanismo de Acción de los Aceites Esenciales Sobre Microorganismos:

Los aceites esenciales son mezclas complejas de numerosas moléculas con gran diversidad de grupos químicos, la actividad antimicrobiana no se debe a un mecanismo específico, ya que en las células hay diferentes sitios donde pueden actuar y los eventos pueden llevarse a cabo en forma independiente, simultánea o consecuente ⁽²⁰⁾.

El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales les permite incorporarse en los lípidos de las membranas bacterianas y mitocondriales perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo. Los aceites esenciales también podrían actuar sobre las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática interfiriendo en la interacción lípido-proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular. Otra posible acción sería la interacción directa de los componentes lipofílicos con las partes hidrofóbicas de la molécula de proteína ⁽²⁰⁾.

e) **Extracción del aceite esencial:**

La obtención de un aceite esencial comienza por la preparación del material vegetal que se recolecta antes, durante o tras la floración. Se recolectan las hojas, flores, tallos y rizomas, según sea el material de interés. En la mayoría de los casos se requiere de una preparación del material antes de la destilación. Estas pueden ser: limpieza, trituración, remojado (en los casos en que el material es muy duro) y secado. Los métodos comerciales más comunes de los aceites esenciales pueden clasificarse prensado, expresión y destilación ⁽¹⁸⁾.

En el enflorado (enfleurage por su nombre original en francés) se utilizan grasas naturales con temperaturas de ablandamiento alrededor de 40° C, normalmente manteca de cerdo refinada, blanqueada y desodorizada. La grasa se extiende en bandejas de profundidad no mayor a 0,5 cm y sobre ellas se coloca el material vegetal de donde se van a extraer los componentes aromáticos. El contacto puede durar de 3 a 5 días. Pasado ese tiempo, el material vegetal es retirado y reemplazado por material fresco, repitiendo la operación hasta la saturación de la grasa. Posteriormente, la grasa impregnada del principio activo se lava con etanol. El etanol se filtra y se destila a vacío (20 mm de Hg) hasta recuperar un 80% del volumen de etanol, separándolo así del residuo, que se conoce como aceite absoluto. Es un método aplicado para las flores de jazmín y lavanda ⁽¹⁸⁾.

En el prensado, el material vegetal es sometido a presión, bien sea en prensas discontinuas (tipo batch) o continuas. Para los cítricos, en la antigüedad se empleaba el método manual de la esponja, que consistía en exprimir manualmente las cáscaras de la fruta con una esponja hasta que se empapa de aceite. Posteriormente se exprimía la esponja y se liberaba el aceite esencial. Aunque se considera que es el método que proporciona los aceites esenciales de mayor calidad, en la actualidad no se usa comercialmente ⁽¹⁸⁾.

La expresión o expresión en frío es usada en las frutas cítricas y consiste en exprimir mecánicamente las cortezas de las frutas para liberar el aceite esencial a temperatura ambiente. El pericarpio de las frutas es presionado y el fluido que contiene el aceite esencial es separado. Generalmente se usa agua para mejorar la remoción del aceite esencial de los residuos sólidos. El aceite esencial es separado de la emulsión obtenida mediante gravedad, centrifugación o destilación fraccionada ⁽¹⁸⁾.

La destilación es uno de los procedimientos más empleados para la obtención de aceites esenciales, debido a su simplicidad en cuanto a equipos a utilizar y al bajo costo. La destilación puede ser definida como una operación en la cual una mezcla de sustancias es separada en sus componentes mediante el uso de calor. En el caso particular de los aceites esenciales, industrialmente son varios los métodos utilizados de acuerdo a la manera en que estén en contacto el agua y el material vegetal: hidrodestilación, destilación por arrastre con agua-vapor, destilación por arrastre con vapor y destilación seca ⁽¹⁸⁾.

MICROBIOS EN LA CAVIDAD BUCAL

a) Particularidades:

En la actualidad, se sabe que la cavidad oral humana es un ecosistema dinámico y permite la subsistencia de una enorme cantidad de microorganismos muy diversos. De hecho, existen alrededor de un millón de microorganismos por mililitro de saliva. Los habitantes de la saliva, en su mayoría bacterias y hongos, están ahí porque se desprenden de los tejidos duros y blandos de la cavidad oral y la nasofaringe y se multiplican en depósitos retenidos de saliva ⁽²¹⁾.

El uso de técnicas microbiológicas, aunado a técnicas complejas y sensibles de biología molecular, ha ayudado a comenzar a apreciar la diversidad de la microbiota oral. Estimaciones recientes indican que el número de especies distintas de bacterias en la cavidad oral es de alrededor de 700. La investigación en genética, fisiología y bioquímica de la microbiota oral muestra que los colonizadores normales son un componente importante de la salud bucal, y ha permitido comprender la importancia de la ecología oral en el desarrollo de las enfermedades ⁽²¹⁾.

b) Ambiente Oral:

Las bacterias que residen en la cavidad oral ocupan un hábitat único y fascinante. La boca es la única parte del cuerpo humano en el que se encuentran tejidos duros (los dientes) expuestos de manera natural al ambiente externo. Como balanos adheridos al casco de un barco, una variada colección de bacterias se adhiere firmemente a los dientes y prolifera en ellos para formar una compleja biopelícula conocida como placa dentobacteriana. La complejidad de la ecología microbiana oral es magnificada por el

hecho de que la boca también posee otras superficies, como mucosa bucal y vestibular, paladar duro, lengua y piso de la boca, que constituyen hábitats únicos para la colonización microbiana ⁽²¹⁾.

c) Adquisiciones de la microbiota oral:

La cavidad oral suele estar desprovista de colonización bacteriana significativa al nacer. Sin embargo, poco después comienzan a introducirse bacterias de manera continua en la boca a partir de objetos animados e inanimados contaminados. La mayoría de estas bacterias son transitorias; los colonizadores orales exitosos provienen de saliva exógena. Los cuidadores principales u otros contactos cercanos, como los hermanos, suelen ser la fuente de esta saliva con bacterias. En pocos meses, en la mayoría de los casos, la boca tendrá una microbiota con microorganismos orales reconocibles. El siguiente suceso ecológico importante es la erupción de los dientes temporales, hacia los seis meses de edad. La aparición de estas superficies fijas duras permite la colonización de microorganismos minuciosamente adaptados a este ambiente. Bacterias orales como los estreptococos y actinomicetos comprenden así una proporción significativa de los microorganismos de la placa dentobacteriana ⁽²¹⁾.

La microbiota oral continúa desarrollándose, cambiando de composición y actividad general con la edad. Los cambios hormonales durante la pubertad pueden contribuir a una mayor colonización por grupos de anaerobios gramnegativos y espiroquetas, y es posible que algunas hormonas actúen como fuentes de nutrición. En los adultos, cambios graduales relacionados con la edad, nivel de actividad física y estrés fisiológico pueden influir en las cantidades o proporciones de bacterias orales, a través del efecto inmunitario o cantidades en el flujo de saliva. De modo similar, aspectos del

modo de vida como tabaquismo, frecuencia del consumo de carbohidratos o embarazo pueden modificar la composición microbiana ⁽²¹⁾.

d) Mecanismo de Adhesión:

Para adherirse a una superficie bucal, las bacterias que inicialmente están suspendidas en la saliva, primero deben llegar a una estrecha proximidad del sustrato. Muchos factores contribuyen a la rapidez con la que un microorganismo se une a una superficie. Cuando el gasto salival es alto, el transporte y convención provocado por las fuerzas dinámicas causa la acumulación de bacterias en las interfases sólido-líquido, donde hay una capa de frontera viscosa. El arrastre friccional y el barrido turbulento también ayudan al contacto con la superficie. Las irregularidades presentes en las superficies constituyen refugios en los cuales las bacterias pueden protegerse de las fuerzas cortantes ⁽²¹⁾.

Cuando el flujo salival es lento, el transporte y difusión que resulta del movimiento browniano puede ayudar a formar con mayor lentitud la concentración en una superficie de bacterias suspendidas. Algunas especies bacterianas, como las espiroquetas (p. ej., *Treponema denticola*), pueden participar activamente en su depósito superficial mediante respuestas mótils quimiotácticas. Después de la llegada a una superficie, el siguiente cambio es evitar el desplazamiento. En este punto las bacterias contienen partículas inertes con carga negativa, además de que el huésped proporciona una superficie igualmente inerte con carga negativa ⁽²¹⁾.

e) Fisiología de la Microbiota Oral:

Si bien en la boca hay microorganismos transitorios, sólo son colonizadores temporales y no son capaces de competir con los especialistas de la microbiota autóctona, a menos que el huésped sufra un problema fisiológico bastante grave. Bacterias como *Streptococcus mutans* son excelentes ejemplos de microorganismos aptos para el ambiente oral. *S. mutans* no sólo está adaptado para la vida en la boca, sino que está puntualmente adaptado para vivir sólo en superficies duras de la boca. Antes de la erupción de los dientes, no suele ser un miembro permanente de la microbiota oral. En caso de pérdida de todos los dientes sin remplazo por implante o dentadura, desaparece de la boca ⁽²¹⁾.

Además, como otros estreptococos, *S. mutans* tiene múltiples requisitos nutricionales y obtiene del huésped los nutrientes necesarios, ya sea de la saliva o de los alimentos que aquél ingiere. Es un auxótrofo múltiple, lo cual significa que carece de genes que codifiquen las enzimas requeridas para la síntesis de muchos nutrientes necesarios, incluidos muchos aminoácidos y vitaminas. Así, deben obtener estos nutrientes del ambiente ⁽²¹⁾.

Fermentación de Carbohidratos:

La fermentación de azúcares es uno de los mecanismos más importantes y mejor comprendidos de la generación de energía por bacterias orales. En gran medida, ha recibido atención debido a la naturaleza destructiva de los productos finales ácidos de la fermentación y el efecto del ácido en el proceso carioso. Mientras que muchos grupos de bacterias orales son capaces de usar azúcares para su desarrollo, las capacidades cariógenas de los estreptococos y

otras bacterias acidolácticas los hacen un grupo importante de bacterias orales que recibe mucha atención. Estos microorganismos fermentan azúcares derivados del huésped y de los alimentos. De los azúcares derivados del huésped, la mayoría se adquiere mediante la acción de exoglucosidasas bacterianas que desprenden los azúcares de las glucoproteínas salivales del huésped ⁽²¹⁾.

Además, algunas bacterias orales pueden acceder a azúcares del ácido hialurónico del huésped, un componente de la matriz extracelular formado por subunidades disacárido repetitivas, al excretar hialuronidasas que degradan el polímero. Los azúcares liberados pueden ser llevados a la célula por mecanismos de transporte como los sistemas de fosfotransferasa para azúcar. Si bien muchos grupos de bacterias orales son capaces de fermentar azúcares, *Streptococcus mutans* es el miembro de la comunidad oral que más viene a la mente cuando se piensa en fermentación de azúcar, debido a su reconocida asociación con caries. Cuando se cultiva con un exceso de glucosa, *S. mutans* es en gran medida homofermentador, lo cual significa que genera un solo producto de fermentación, lactato ⁽²¹⁾.

FLORA MICROBIANA EN LA CAVIDAD ORAL:

La cavidad oral es un ecosistema donde cohabitan principalmente comensales (aproximadamente 1010 bacterias, siendo el 60% cultivables) pertenecientes entre 500 y 700 especies, que colonizan las mucosas y dientes donde forman la placa bacteriana o biofilm, entre las cuales están los miembros del género *Streptococcus* ⁽²²⁾.

Parece que ciertas especies estreptocócicas orales tienen predilección por colonizar sitios particulares de la boca. *S. sanguis* y *S. mutans* preferiblemente colonizan las superficies de dientes y aparatos prostéticos. *S. salivarius* está presente en bajo número en placa y es un colonizador primario de la boca después del nacimiento, *S. mitior* no tiene un sitio preferido en cavidad oral, *S. sanguis* usualmente no se encuentra sino hasta la erupción de los dientes. Los estreptococos del grupo *mutans* han sido estudiados usando pruebas bioquímicas, serológicas y moleculares que incluyen hibridación ADN-ADN y secuenciación de genes ARN ribosomales. Las especies más importantes en el humano son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Estos se han caracterizado como colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado en relación a la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa ⁽²²⁾.

GRUPO *Streptococcus mutans*

Es considerada la especie más frecuentemente aislada de las lesiones cariosas. En 1924, Clarke lo aisló de algunas lesiones de caries de seres humanos. Le dio el nombre de “mutans” porque a veces se observaban como cocos en cadena y en ocasiones como cocobacilos, es decir, un comportamiento pleomórfico (modificación de forma) ⁽²³⁾.

La adhesión de este microorganismo esta mediada por la interacción entre una proteína PAc y algunas de la saliva que son adsorbidas por el esmalte dental; la capacidad de acumulación en la placa ocurre cuando *S. mutans* produce glucanos solubles e insolubles utilizando las enzimas glucosiltransferasas (GTFs), a partir de los azúcares de la dieta. Cuando la unión se hace más fuerte, las bacterias degradan la sacarosa a ácidos., como el láctico, que desmineralizan el diente, formando la cavidad que se encuentra en la caries dental ⁽²³⁾.

Las glucosiltransferasas son tres enzimas –GTB B, GTB C Y GTB D- que desdoblan la sacarosa, sintetizando glucanos insolubles que dan soporte a la placa bacteriana; también producen glucanos solubles que les sirven como fuente de nutrición ⁽²²⁾. Estudios previos han demostrado que *S. mutans* no se adhiere bien a las superficies epiteliales, por lo que parecería extraño aislar cepas en muestras provenientes de bebés edéntulos, ya que solo poseen superficies mucosas y expuestas permanentemente al flujo salival. Sin embargo, se han encontrado cepas de *S. mutans* en bebés predentales, lo que hace pensar que estas cepas son transeúntes y no establecidas definitivamente, pues no se pueden mantener libres en la saliva, sino que necesitan estar adheridas a una superficie dura como el diente ⁽²³⁾.

a) Transformación de la sacarosa:

El sustrato más importante para la bacteria oral *S. mutans* con respecto a su papel como agente etiológico del proceso carioso es un disacárido que se consume de forma habitual en la gran mayoría de la población humana: la sacarosa. Este carbohidrato está compuesto de una unidad D-glucosa y otra unidad D-fructosa ⁽²⁴⁾.

Este disacárido va a tener una gran importancia, ya que no sólo es utilizado como fuente primaria de energía, sino que permite el inicio de reacciones bioquímicas adicionales responsables del potencial cariogéno de esta bacteria ⁽²⁴⁾.

Las vías involucradas en el metabolismo de la sacarosa son tres: Producción a partir de dicho azúcar de polímeros hidrocarbonados, extracelulares adhesivos, por enzimas extracelulares ligadas a la célula ⁽²⁴⁾.

Transpone de la sacarosa al interior de la célula seguido de fosforilación y utilización de energía por medio de la vía glicolítica, conduciendo fundamentalmente a la producción de ácido láctico como producto final ⁽²⁴⁾.

Utilización de los metabolitos intermedios de la sacarosa (glucosa y fructosa) para la síntesis de polisacáridos intracelulares que proporcionan un reservorio de energía ⁽²⁴⁾.

Poder patógeno y virulencia de *S. mutans*.

a) Caries dental: Patología:

La caries es considerada comúnmente como una enfermedad infecciosa que causa la destrucción localizada de los tejidos dentales duros debido a los ácidos producidos por las bacterias que existen adheridas a los dientes. Este efecto puede afectar al esmalte, la dentina. Clínicamente se caracteriza por un cambio de color y descalcificación de los tejidos afectados. A medida que avanza el proceso, se destruyen los tejidos y se forman cavidades ⁽²⁴⁾.

La verdadera disolución de la materia inorgánica de la estructura dentaria es producida por los ácidos orgánicos que son subproductos del metabolismo bacteriano de los hidratos de carbono de la dieta. Cuando la concentración de iones sobre la superficie del diente aumenta como resultado de la fermentación de los azúcares o por parte de enzimas bacterianas de la placa dental, la hidroxiapatita del esmalte comienza a disolverse al igual que hará la dentina en estados posteriores del proceso de la caries ⁽²⁴⁾.

b) Papel de *S. mutans* en caries dental:

El *S. mutans* no coloniza la boca antes de la erupción dental y requiere superficies no descamativas, como los dientes o las prótesis dentales, su número en superficies epiteliales y en saliva es bajo. La ventana de infección se encuentra en torno a los 26 meses de edad; sin embargo, el Departamento de Odontopediatría de la Universidad de Connecticut (USA) sugiere que las primeras visitas del niño al odontólogo sean antes de cumplir el primer año de edad, dado que se han observado colonias de *S. mutans* antes de los 10 meses

de edad. El infante probablemente adquiere el *S. mutans* a partir de sus padres u otras personas con las que tengan contactos frecuentes ⁽²⁵⁾.

Los resultados de un estudio indican que los ancianos con dientes naturales o artificiales, pueden ser portadores de *S. mutans* con diferentes grados de potencial cariogénico y pueden colaborar en la transmisión inicial de microorganismos cariogénicos a los niños, no obstante, las madres suelen ser la principal fuente de infección, Diversas pruebas in vitro han demostrado que la acumulación ácida creada por las colonias de *S. mutans*, es sustancialmente mayor que la producida por otros microorganismos. Los *Streptococcus mutans* presentan un potencial de producción de caries muy superior al de cualquier microorganismo acidogénico de la placa supragingival. Existe una relación directa entre la cantidad-calidad de la caries y el número de *S. mutans* presentes en la boca ⁽²⁵⁾.

III. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis Alternativa:

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), tiene efecto antibacteriano in vitro sobre *Streptococcus mutans sp.*

3.2 Hipótesis Nula:

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), no tiene efecto antibacteriano in vitro sobre *Streptococcus mutans sp.*

IV. METODOLOGÍA

4.1 Diseño de investigación.

El diseño fue un trabajo de investigación de tipo experimental, con estímulo creciente y control

El control negativo fue el dimetilsulfoxido (DMSO), que se empleó para la disolución del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), para obtener las concentraciones de 10%, 15%, 25%, y 50%.

4.2 Población y Muestra

Población Vegetal: Se trabajó con el aceite esencial de *Syzygium aromaticum*, (clavo de olor) obtenido del laboratorio Aromas del Perú de la ciudad de Lima

Criterios de inclusión:

El aceite esencial de clavo está formado por una gran variedad de compuestos. Su composición varía dependiendo de su procedencia. Entre sus componentes destaca eugenol (49-98%) como compuesto mayoritario, beta-cariofileno (42%) y eugenil acetato (0,5-21%). Además, se pueden encontrar pequeñas cantidades de alfa-humuleno y trazas (< 1%) de otros 25 a 35 constituyentes. Los compuestos con estructura fenólica demostraron tener una actividad antimicrobiana superior debido a su carácter hidrofóbico. Estudios dan importancia al grupo hidroxilo y su localización en la estructura fenólica para obtener una mayor capacidad antimicrobiana ⁽²⁵⁾

El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) se adquirió del laboratorio Aromas del Perú de la ciudad de Lima, en condiciones óptimas y adecuadas como transporte, envase o recipiente que lo contenía y almacenamiento, con la finalidad de mantener tanto propiedades físicas, químicas y organolépticas.

Criterios de exclusión:

Esta planta es originaria del sudeste asiático, en especial de las islas Molucas (Indonesia), siendo cultivado en Zanzibar, Pemba (Tanzania), Indonesia, Malasia, Madagascar, Sri Lanka, Sumatra y la isla de Santa María. Posteriormente se introdujo en América (Antillas y Brasil), zona oriental de África tropical y china ⁽¹⁵⁾.

El *S. aromaticum* (*clavo de olor*) se encuentra comúnmente en el bosque y la selva. Se da en todas las situaciones que van desde el nivel del mar hasta una altitud de 900 m, con temperatura media anual alrededor de los 25 ° C, y precipitación media anual de 1 500-2 500 mm. ⁽²⁷⁾. En el Perú no se siembra el clavo de olor solo se obtiene ya en botones florales es por eso que se compró ya extraído en aceite esencial.

Población Microbiológica:

Las muestras con las que se trabajaron fueron la cepa de *Streptococcus mutans* sp. ATCC®25175, que se obtuvieron del laboratorio GenLab del Perú Sac.

Muestra Microbiológica:

Se trabajó con colonias jóvenes de *Streptococcus mutans* sp. ATCC®25175

4.3 Definición y Operacionalización de las variables.

Variables	Definición Conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medidas
Variable Independiente Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor)	Son líquidos volátiles, insolubles en agua, pero fácilmente solubles en alcohol, éter. Tienen importancia en medicina, tanto por su sabor como por su efecto calmante del dolor y su valor fisiológico ⁽²⁸⁾ .	Se trabajó con 5 concentraciones diferentes.	10% v/v 15 % v/v 25% v/v 50% v/v 100% v/v	Cualitativas Nominales
Variable Dependiente Efecto antimicrobiano	Sustancia natural o producto químico de síntesis capaz de detener la multiplicación de las bacterias o destruirlas ⁽²⁹⁾	Se determinó a través de la medición de los halos de inhibición	Medida del halo de inhibición en mm	Cuantitativas de razón

4.4 Técnicas e instrumentos de la investigación

Técnica: Observacional

Procedimiento:

Obtención del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor): La obtención del aceite esencial se realizó adquiriéndolo en el laboratorio de aceites esenciales de la ciudad de Lima Capital del Perú, Aromas del Perú Sac.

Obtención de la cepa liofilizada de *Streptococcus mutans* sp.:

La cepa liofilizada de *Streptococcus. mutans* (ATCC 25175) fue obtenida de los laboratorios GenLab del Peru SAC. de Microbiologics TM.

Activación de la cepa liofilizada de *Streptococcus mutans* sp.:

Para la activación de *Streptococcus. mutans* (ATCC 25175), se procedió a la esterilización del ambiente, se empezó abriendo los liófilos que se encontraban dentro de un vial de plástico que le servía como protección, el cual contenía a la cepa *Streptococcus. mutans* (ATCC 25175), un fluido de hidratación y un hisopo estéril. Se procedió a romper el fluido de hidratación, luego se hizo la homogenización de la cepa de *Streptococcus. mutans* (ATCC 25175) con el fluido para poder activarlas.

Una vez activada la cepa de *Streptococcus. mutans* (ATCC 25175), se realizó el sembrado en placas Petri en cultivo Brain Heart Infusion Agar que fue indicado dentro del manual de activación de cepas bacterianas del laboratorio GenLab, El sembrado se realizó con el hisopo estéril, luego pasamos a esterilizar el asa bacteriológica para proceder al estriamiento de la cepa de *Streptococcus. Mutans*

sp. (ATCC 25175), dichas bacterias necesitan de un ambiente anaeróbico para su desarrollo adecuado el cual se logró colocándoles en una jarra GasPack durante 48 horas a 37° logrando el crecimiento bacteriano.

Ejecución de ensayos:

Se empezó diluyendo el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), con dimetilsulfoxido, para obtener las cinco concentraciones que fueron del 10%, 15%, 25%, 50% y 100%. Para la concentración del 10% se utilizó 0.9 ul de (DMSO) y 0.1 ul de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor). Para la concentración del 15% se utilizó 0.85 ul de (DMSO) y 0.15 ul de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor). Para la concentración del 25% se utilizó 0.75 ul de (DMSO) y 0.25 ul de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor). Para la concentración del 50% se utilizó 0.50 ul de (DMSO) y 0.50 ul de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor).

De una colonia aislada se procedió a realizar la siembra en un tubo de ensayo estéril que contenía 5 ml de suero fisiológico, se agito por un promedio de 3 minutos alcanzando la turbidez equivalente al tubo 0.5 de McFarland que se usa como referencia en suspensiones bacteriológicas.

Listas las colonias se procedió hacer la siembra en las placas Petri con Brain Heart Infusion Agar, en total fueron 20 placas, las cuales se dividieron en dos cuadrantes, y con la ayuda de una micro pipeta se colocó una gota de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor). En cada cuadrante a diferentes concentraciones.

Luego las placas fueron colocadas en la jarra GasPack, y llevadas a la incubadora por 24 horas a 37°. Para luego proceder a la lectura.

Lectura de los ensayos:

Para la lectura de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones se utilizó una regla milimetrada que abarco el diámetro del halo en mm. Y se procedió a recolectar datos en una tabla los cuales posteriormente se procesó estadísticamente.

4.5 Plan de Análisis:

Para los estudios y evaluación de los resultados obtenidos se realizó el análisis estadístico en las muestras de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), con acción antibacteriana sobre *Streptococcus. Mutans sp*, (ATCC 25175), habiéndose medido el halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

Los resultados son presentados en tablas y gráficos, utilizando el programa Excel Microsoft y el programa estadístico ANOVA.

4.6 Matriz de consistencia.

Título de la Investigación	Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Tipo de Investigación Diseño	Variables	Definición Operacional	Indicadores y Escala de Medición	Plan de Análisis
Efecto Antibacteriano in vitro del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (Clavo de olor), Sobre cepa de <i>Streptococcus mutans sp.</i>	¿Tendrá alguna acción antibacteriana in vitro, el aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor), sobre cepa de <i>Streptococcus mutans sp.</i> ?	<p>Objetivo General: Determinar el efecto antibacteriano que posee el aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor), sobre <i>Streptococcus mutans sp.</i></p> <p>Objetivo Específicos: *Evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> sobre <i>streptococcus mutans sp.</i> *Comparar el efecto antibacteriano de 5 diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> sobre <i>Streptococcus mutans sp.</i></p>	<p>Hipótesis Alternativa: El aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor), tiene efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans sp.</i></p> <p>Hipótesis Nula: El aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor), no tiene efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Streptococcus mutans sp.</i></p>	Experimental con estímulo creciente y control	<p>Variable Independiente Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).</p> <p>Variable dependiente: Efecto antimicrobiano</p>	Se trabajó con 5 concentraciones diferentes. Se determinó a través de la medición de halos de inhibición	<p>10% v/v 15% v/v 25% v/v 50% v/v 100% v/v</p> <p>Cualitativas Nominal</p> <p>Medida del halo de inhibición en mm</p> <p>Cuantitativas de Razón</p>	Prueba ANOVA

4.7 Principios éticos.

Se tuvo en cuenta y se respetó debidamente las normas de bioseguridad que implica dentro y fuera del laboratorio, se manipulo adecuadamente las muestras sobretodo la cepa liofilizada de *Streptococcus. mutans* (ATCC 25175), de acuerdo al manual de bioseguridad después se procedió al manejo de desechos bajo estrictas normas de bioseguridad para este tipo de estudios con microorganismos, para lo cual se contó con personas capacitadas del laboratorio encargadas de dicho proceso.

V. RESULTADOS

TABLA 1

Efecto inhibitorio sobre crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans Sp.* según la concentración del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor).

Concentraciones	Halos de inhibición (mm)								Promedio± Desviación Estándar	Significancia
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 10%	1	3	3	4	4	4	4	6	3.63 ± 1.41	
Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 15%	6	6	8	9	9	9	9	10	8.38 ± 1.59	
Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 25%	11	11	17	17	17	18	19	20	16.25 ± 3.41	P=0.000**
Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 50%	22	23	24	24	30	30	32	35	27.5 ± 4.84	
Aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> al 100%	60	60	60	62	62	63	65	65	62.13 ± 2.10	

** P < 0,01 PRUEBA ANOVA

5.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En el presente trabajo se quiso evaluar y señalar si el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento de cepas aisladas de *Streptococcus mutans sp*, agente causal de la caries dental. En lo cual se pudo comprobar que efectivamente el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), inhibe el crecimiento de esta bacteria. Por otro lado, conforme a los efectos obtenidos, se pudo encontrar diferencias significativas con respecto a los halos de inhibición en las diferentes concentraciones utilizadas del aceite antes mencionado.

En la Tabla 1, se observa el efecto de las concentraciones al 10%; 15%; 25%; 50%; y 100% del aceite esencial sobre *Streptococcus mutans sp*. observándose promedios y desviación estándar para los halos de inhibición correspondiente de 3.63 ± 1.41 mm; 8.36 ± 1.59 ; 16.25 ± 3.41 ; 27.5 ± 4.84 ; 62.13 ± 2.10 respectivamente. Estos resultados difieren de lo encontrado por Díaz ⁽⁹⁾ quien reporta que los halos de inhibición sobre cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, alcanzaron con concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%, valores de 20mm, 22mm, 21mm y 22mm respectivamente eso es debido a que puede influir en gran magnitud la forma o método utilizado para la extracción ya que variará su composición y por ende acción. Sin embargo, también se demostró un efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*, en todas las concentraciones evaluadas para el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor).

Según Conrado⁽⁶⁾ en el 2013, generalmente, los aceites esenciales que poseen elevada actividad antibacteriana frente a patógenos resistentes, concentran su acción en distintos componentes del aceite esencial sobre la célula, estos componentes llamados compuestos fenólicos como carvacrol, eugenol y timol en altas concentraciones, son los responsables de dicha actividad antibacteriana.

La acción antibacteriana de estos compuestos se atribuye a una acción a nivel de la membrana celular que desencadena su disrupción, mediante el aumento de la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos efectos produce la muerte en la célula bacteriana⁽³⁰⁾.

A esto le responde Gonzales⁽³¹⁾ en el 2016 el eugenol en altas concentraciones tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los fenoles por degeneración de las proteínas, lo que da por un daño a la membrana celular, a diferencia de que en bajas concentraciones tiende a estabilizar las membranas celulares, lo cual previene la penetración de las bacterias a los conductos dentinarios.

Esta definición explica la actividad antibacteriana de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), ya que por ser rico en eugenol presenta un efecto inhibitorio frente a bacterias como *Streptococcus mutans sp.* que es un habitante normal de la flora bucal de las personas, pero presenta sensibilidad frente a este aceite esencial.

Aportando con esta investigación podemos hacer mención de datos importantes, como que al exponer a *Streptococcus mutans sp*, a concentraciones menores, de 10% y 15% y teniendo referencia de otros estudios realizados a mayores concentraciones podemos afirmar que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), si presenta actividad antibacteriana sobre *Streptococcus mutans sp*, a concentraciones menores.

Por último, al comprobar en esta tesis que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), si inhibe cepas de *Streptococcus mutans sp*. da el modelo para poder continuar con más investigaciones a partir de ésta o crear productos afines a base de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), como dentríficos, cremas tópicas y colutorios que ayudarán al control de caries dental.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones.

- El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), a concentraciones del 10%, 15%, 25%, 50% y 100%, si presentó acción antibacteriana sobre el cultivo de *Streptococcus mutans sp.*
- La concentración del 100% del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), fue la que presentó mayor actividad antibacteriana que las del 10%, 15%, 25% y 50% ($p < 0,01$).

6.2 Recomendaciones.

- Hacer más estudios de investigación para identificar si solo el principio activo que ejerce efecto antimicrobiano en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), es el eugenol o hay otros principios que también ejercen tal efecto.
- Se recomienda realizar estudios que permitan encontrar una concentración mínima en la cual el *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), presenta acción bacteriana.
- Se recomienda hacer estudios sobre la posibilidad del uso de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), en colutorios en el cual no cause irritaciones a nivel de la cavidad oral, pero que si presenta una acción bacteriana sobre ciertos agentes patógenos causantes de la caries dental.

VII.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Cabezas C, Bartolo M. Las plantas medicinales y el desarrollo nacional. Boletín Inst. Nac. Salud [En línea]. Lima, 2012. [Citado 03 de abril 2016]; 18 (9-10): 155. Disponible en: <http://docplayer.es/5347264-Peru-lima-peruministerio-de-salud-instituto-nacional-de-salud-ministerio-de-salud-institutonacional-de-salud.html>.
2. Ponz E. La medicina tradicional de la tacana y machineri. [En línea]. Bolivia: Fundación PEB; 2005 [Citado 03 de abril 2016]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=3XCnbg0o3doC&pg=PR3&lpg=PR3&dq=Elizabeth+Ponz+Sejas.+La+medicina+tradicional+de+los+tacana+y+machineri&source=bl&ots=uOc9xpxrZ&sig=eJOMj32fbKra82rIzXW9gwZNXgc&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiau_DwjZbMAhWG7B4KHe3QC3UQ6AEIIDAB#v=onepage&q=Elizabeth%20Ponz%20Sejas.%20La%20medicina%20tradicional%20de%20los%20tacana%20y%20machineri&f=false.
3. Oblitas G, et al. Empleo de plantas medicinales en usuarios de dos hospitales referenciales del Cusco, Perú. Rev. Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. [En línea]. 2013. [Citado 02 de mayo 2017]; 30 (1). Disponible en: <http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/159/2378>
4. Soto M, Leiva M. Estudio exomorfológico y fitoquímico de los bulbos de dos especies endémicas del Perú de la familia Amaryllidaceae. Rev. ARNALDOA. [En línea]. 2015. [Citado 02 de mayo 2017]; 22 (1). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/304473050_Estudio_exomorfologico

o_y_fitoquimico_de_los_bulbos_y_hojas_de_Rauhia_multiflora_Kunth_Ravenna_Amaryllidaceae_endemica_del_norte_del_Peru

5. Aguilar A, López A. Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. Programa de Doctorado. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. [En línea]. 2013. [Citado 02 de mayo 2017]; No .7 (35-41). Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Aguilar-Gonzalez-et-al-2013.pdf>
6. Marroquín C. Evaluación del efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en bacterias comúnmente aisladas en cavidad oral de perros en los años 2012 – 2013. [Tesis Doctoral]. [En línea]. Guatemala. Universidad De San Carlos. 2015. [Citado 02 de mayo 2017]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/2302/1/Tesis%20Med%20Vet%20Conrado%20Marroquin.pdf>
7. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *Streptococcus mutans* y caries dental. CES odontol [En línea]. 2013. [Citado 02 de mayo 2017]; 26 (1). Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
8. De los Ángeles T y Veloz T. Eficacia in-vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam.) Kostern. ex O.C.Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry. Artículo Científico. La Granja. CIVABI. [En línea]. 2011. [Citado 17 de abril de 2016]; Vol. 13 (1): 31-41. Disponible en:

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8774/1/Eficacia%20intro%20de%20un%20colutorio%20elaborado%20con%20aceite%20esencial%20de%20la%20hoja%20de%20ishingo%20Ocotea%20quixos.pdf>

9. Díaz V. “Efecto inhibitor del aceite esencial de clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” como agente antimicrobiano, sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro” [Tesis Doctoral]. [En línea]. Quito; Universidad Central del Ecuador: 2016. [Citado 17 de abril 2016]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7375/1/T-UCE-0015-380.pdf>
10. Cerga L. “Efecto Inhibidor del Aceite Esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (CANELA) y *Syzygium aromaticum* (Clavo De Olor). En Diferentes Concentraciones En Comparación Con Gluconato De Clorhexidina Al 2% Frente A Cepas de *Enterococcus Faecalis*. Estudio In Vitro. Lima 2014”. [Tesis Doctoral]. [En línea]. Lima; Universidad Privada Norbert Wiener: 2015: [Citado 17 de abril 2016]. Disponible: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/196/CERGA%20RODRIGUEZ.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
11. Núñez N y Chuan I. “Evaluación Del Efecto Antimicrobiano A Diferentes Concentraciones De Aceite Esencial De Clavo De Olor (*Eugenia Caryophyllata*) En La Conservación De Carne Molida Almacenada En Refrigeración, Lambayeque- 2012”. [Tesis Doctoral]. [En línea]. Lambayeque; Universidad Señor de Sipan: 2014. [Citado 17 de abril 2016]. Disponible en:

http://repositorio.uss.edu.pe/handle/uss/829/browse?type=dateissued&sort_by=1&order=ASC&rpp=45&etal=0

12. Gamboa J. y Vásquez M. Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. *Revista Científica de Estudiantes. UNT. REBIOLEST*. [En línea]. 2015. [Citado 17 de abril de 2016]; 1 (3): e42 Disponible en: <http://www.revistas.unitru.edu.pe/index.php/ECCBB/article/view/894/823>
13. Armas C, Márquez L y Pretell C. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays L.*), variedad morado. *Revista Oficial. UPAO. Pueblo Continente*. [En línea]. 2011; [Citado 17 de abril 2016]; N° 01 (22). Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/459>.
14. Muñoz F. *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*. Instituto Nacional de Investigación Agraria. [En línea]. Madrid: Mundi-Prensa Libros; Ed. Aedos, s. a 2002. [Citado 21 de mayo 2016]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=WmX5TibuSrIC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
15. Romero D. *Plantas Aromáticas. Tratado de aromaterapia científica*. [En línea]. Buenos Aires: Editorial Kier; 2004. [Citado 21 de mayo 2016]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=OhbQymtQUP4C&pg=PA3&dq=mon>

ica+diana+romero+marquez&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjvLf_z3cAhWB
uVMKHaykDt4Q6AEILDAB#v=onepage&q=monica%20diana%20romero
%20marquez&f=false

16. Azogue D. “Evaluación De Eugenol (Extracto Del Clavo De Olor) Como Limpiador Bucal Natural En Caninos En La Clinica Veterinaria Patitas Traviesas En La Parroquia De Machachi Cantón Mejía”. [Tesis Doctoral]. [En línea]. Ecuador; Universidad Técnica De Cotopaxi; 2015. [Citado 17 de abril 2016]. Disponible en:<http://181.112.224.103/bitstream/27000/2846/1/T-UTC-00370.pdf>.
17. Alonso J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. [En línea]. Buenos Aires: Corpus Editorial; 2007. [Citado 21 de junio de 2017]. Disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=11087865&p00=tratado+fitofarmacos>.
18. Pino J. Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos. [En línea]. Cuba: Ed. Universitaria; 2015. [Citado 21 de mayo 2016]. Disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=11125861&p00=aceite+esencial+clavo+olor>.
19. López M. Los aceites esenciales Aplicaciones Farmacológicas Cosméticas y Alimentarias. Ámbito Farmacéutico Aromaterapia: Q.F.F.A.R.M. [En línea]. 2004. [Citado 21 de mayo 2016] Vol. 23 (7). Disponible en: http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13064296&pident_usuario=0&pcontactid=&pident_revista=4&ty=67&accion=L&or

igen=zonadelectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=4v23n07a1306
4296pdf001.pdf.

20. Castaño M. Evaluación De La Capacidad Conservante De Los Aceites Esenciales De Clavo (*Syzygium Aromaticum*) Y Canela (*Cinnamomum Verum*), Sobre La Levadura (*Rhodotorula Mucilaginosa*) En Leche Chocolateada. [Tesis Doctoral]. [En línea]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia Medellín; 2012. [Citado 21 de junio 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9149/1/43013611.2012.pdf>.
21. Lamont R, Hajishengallis G y Jenkinson H. Microbiología e inmunología oral. [En línea]. México City: Editorial El Manual moderno; 2015. [Citado 21 de junio 2017] Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliocauladechsp/reader.action?docID=4184541&query=microbiologia+e+inmunologia+oral>
22. Ojeda J, Oviedo E y. Andrés L. Streptococcus mutans y caries dental. Scielo. [En línea]. 2013. [Citado 21 de mayo 2016]. Nro. 1. URL. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120971X2013000100005
23. Acosta A, et al. Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. [En línea]. 1a Edicion Bogotá: Editorial Pontificia Universidad Javeriana Colombia; 2006. [Citado 21 de mayo 2016]. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=4szLuVOtgC0C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

24. Cabronero M. Estudio de streptococcus mutans en un modelo experimental: aportaciones etiopatogénicas. [En línea]. Madrid, ES: Universidad Complutense de Madrid; 2005. [Citado 21 de junio 2017]. Disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=10095436&p00=streptococcus+mutans>
25. García M, Rioboo R y Romero M. Estudio a doble ciego aleatorio, sobre la prevención quimioterapéutica de la caries dental con barnices de clorhexidina y timol en niños de 5 a 8 años. [En línea]. Madrid, ES: Universidad Complutense de Madrid; 2006. [Citado 21 de junio 2017]. Disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=10116098&p00=papel+s.+mutans+caries+dental%3A>
26. Vaca V. Estudio de la aplicación de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) para optimizar la calidad microbiológica y sensorial de cuatro tipos de hortalizas: col de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata* cv. bronco), col morada (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*), lechuga iceberg tipo salinas (*Lactuca sativa* var. *capitata*) y espinaca (*Spinacia oleracea* L.)” [Tesis Doctoral] [En línea]. Ecuador: Universidad Técnica De Ambato; 2013. [Citado 21 de junio 2017]. Disponible en: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8418/1/AL%20529.pdf>
27. Pino J. Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos. [En línea]. Havana: Editorial Universitaria; 2015. [Citado 21 de mayo 2016]. Disponible

en:<http://site.ebrary.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=11125861>
& p00=aceite+esencial+clavo+olor.

28. Wilkinson J y Moore R. Cosmetología de Harry. [En línea]. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 1990. [Citado de mayo 2016]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=fnQ9mGMH15oC&pg=PA149&dq=actividad+antimicrobiana+de+aceites+esenciales&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiquImxhf7MAhUJpx4KHav7CyIQ6AEIHjAB#v=onepage&q=actividad%20antimicrobiana%20de%20aceites%20esenciales&f=false>.
29. Ojeda J, Oviedo E, Salas L. Streptococcus mutans y caries dental. Revista CES Odontología. [En línea]. Volumen 26 N° 1 [Citado 21 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>
30. Erazo M, et al. Efecto antimicrobiano del cinamaldehído, timol, eugenol y quitosano sobre cepas de Streptococcus mutans. [En línea]. Revista Cubana de Estomatología 2017;54(4). [Citado 07 de agosto de 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revcubest/esc-2017/esc174e.pdf>
31. Gonzales R. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. Revista Cubana Estomatología [En línea]. Ciudad de La Habana: 2002. [Citado 21 de mayo 2016] Vol. 39 N° 2. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475072002000200005

VIII. ANEXOS

Figura 01.

Boleta de compra del medio de cultivo



GenLab
del Perú SAG
Tecnologías para la Vida

COTIZACION GL - 16 / 014676

FECHA: lunes, 11 de julio de 2016

CLIENTE: UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE
ATENCION: MBLGO. JOSÉ GUTIERREZ

REFERENCIA: MEDIOS DE CULTIVO - LIOFILCHEM

PRECIO: **NUEVOS SOLES** VALIDEZ: 7 DIAS
ENTREGA: A 45 DIAS PAGO: **DEPOSITO ADELANTADO**

CODIGO	PRODUCTO	PRECIO UNITARIO S/.	CANT	PRECIO TOTAL S/.
020973-A	BRAIN Heart Infusion Agar 500 g Medium for cultivation of fastidious aerobic and anaerobic bacteria. Cod LIOFILCHEM: 610007	293.30	1	293.30
020974-A	BRAIN Heart Infusion Broth 500 g Medium for cultivation of fastidious aerobic and anaerobic bacteria. Cod LIOFILCHEM: 610008	277.47	1	277.47
SUB TOTAL			570.77	
I.G.V. (18%) DE LEY			102.74	
TOTAL			673.51	

Blgo. Gino Angello Saavedra Cotrina **LA COTIZACIÓN INCLUYE GASTOS DE ENVÍO**
Asesor Comercial

Realice el pago con cheque a nombre de GEN LAB DEL PERU S.A.C., en caso de Depósito Bancario, realice el abono en nuestra Cuenta Bancaria:
Banco Continental - Soles 0011-0139-0100024183-34 ó Banco BCP - Soles 193-1440607-0-84

Jr. Capac Yupanqui N° 2434 - (Alt. Cdra. 8 Av. 2 de Mayo) - Lince - Lima 14 PERU
Telf.: 2037500 / 2037504 TeleFax: (51-1) 2037501
e-mail: ventas@genlabperu.com

Figura 02.

Boleta de compra de la bacteria *Streptococcus mutans* sp. del laboratorio GenLab



GenLab
del Perú SAC
Tecnologías para la Vida

COTIZACION GL - 16 / 014675

FECHA: lunes, 11 de julio de 2016

CLIENTE: UNIVERSIDAD CATOLICA LOS ANGELES DE CHIMBOTE
 ATENCION: MBLGO. JOSÉ APONTE

REFERENCIA: CEPAS DE REFERENCIA

PRECIO: NUEVOS SOLES
 ENTREGA: A 30 DIAS

VALIDEZ: 7 DIAS
 PAGO: DEPOSITO ADELANTADO

CODIGO	PRODUCTO	PRECIO UNITARIO S/.	CANT	PRECIO TOTAL S/.
H05666-A	Individual Microorganism <i>Streptococcus mutans</i> ATCC® 25175™* COD MICROBIOLOGICS: 0266P	286.22	1	286.22
SUB TOTAL				286.22
I.G.V. (18%) DE LEY				51.52
TOTAL				337.74

Blgo. Gino Angello Saavedra Cotrina
Asesor Comercial

KWIK-STIK: Pack de 2 cepas liofilizadas no mayor al 4to. pasaje + Certificado de Análisis.
 Producto sujeto a disponibilidad del proveedor y a la política de fechas de expira de Microbiologics.

LA COTIZACIÓN INCLUYE GASTOS DE ENVÍO

Realice el pago con cheque a nombre de GEN LAB DEL PERU S.A.C., en caso de Depósito Bancario, realice el abono en nuestra Cuenta Bancaria:
 Banco Continental - Soles 0011-0139-0100024183-34 ó Banco BCP - Soles 193-1440607-0-84
 CCI Continental - Soles 011-139-000100024183-34 ó CCI Banco BCP - Soles 002-193-001440607084-18

Jr. Capac Yupanqui N° 2434 - (Alt. Cdra. 8 Av. 2 de Mayo) - Lince - Lima 14 PERU
 Telf.: 2037500 / 2037504 TeleFax: (51-1) 2037501
 e-mail: ventas@genlabperu.com

Figura 03.

Boleta de compra del aceite esencial de *syzygium aromaticum* (clavo de olor) de Aromas del Perú

Aromas del Perú S.A.
 FABRICANTE DE SABORES, ESENCIAS COLORANTES Y FRAGANCIAS PARA LA INDUSTRIA ALIMENTICIA, FARMACEUTICA, PERFUMERIA, COSMETICA Y OTRAS
 Domicilio fiscal: Av. Alfredo Mendiolá 3915 Los Olivos - Lima - Lima
 Sede Los Olivos: Alfredo Mendiolá 3915 Los Olivos (Alt. Par. Norte Frente Metro Los Olivos) telf: 4252939
 Sede Lima: Jr. Zurillos 1914 Cercado de Lima - Lima - Lima (Alt. Cdra B Av. Colonia) telf: 4249626 - 4245799
 e-mail: aromas@aromasdelperu.com
 www.aromasdelperu.com

R.U.C. Nº 20100459672
BOLETA DE VENTA
 Nº 022 - 0007726

FECHA: 07/10/2015
 SEÑORES: CL48007533 RODRIGUEZ SALINAS ELIZABETH AMA
 DIRECCION: TRUJILLO TRUJILLO TRUJILLO

CANT.	DESCRIPCION	PRECIO TOTAL
1 0 10 KG	HOJAS DE CLAVO 40 ES (GLOVE LEAF OIL REC)	54.90 5.49

SOL: SEIS Y 48/100 DOLARES AMERICANOS

22.00
 TC-347

TOTAL S/:

Una vez entregada la mercadería al comprador, éste se hace responsable por el mal uso, rotura, deterioro, mala conservación del producto y cualquier otro acto ilícito, liberando a la empresa vendedora, de toda responsabilidad, asumiendo la compradora, toda la responsabilidad frente a terceros.

RECIBI CONFORME CANCELADO ADQUIRENTE O USUARIO

Figura 04.

Certificación de origen de prueba del aceite esencial de *syzygium aromaticum* (clavo de olor) de Aromas del Perú

AROMAS DEL PERÚ SA - RUC: 20109459672

ORIGEN DE PRUEBA	ESPECIFICACIONES
PRODUCTO:	ACEITE ESENCIAL DE CLAVO HOJAS RECT. 74% AF.
NOMBRE BOTÁNICO:	<i>Syzygium aromaticum</i> Syn. <i>Eugenia caryophyllata</i>
INCI:	<i>Eugenia caryophyllus</i> -Leaf Oil
CODIGO:	10800000
N. I.T.:	1100003994
CAS:	8000-34-8
OBTENCIÓN:	Destilación por arrastre de vapor
PROCEDENCIA:	Madagascar.
PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS	
ASPECTO	Líquido
COLOR	De Incoloro a Amarillo pálido
OLOR	Clavo, dulce, especiado, cálido
PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	
DENSIDAD A 20 °C	1.028 - 1.046 g/cm ³
INDICE DE REFRACCIÓN A 20 °C	1.529 - 1.536
ROTACIÓN ÓPTICA A 20° C	-3.0 a -0.0 °
PUNTO DE INFLAMACIÓN	>150° C

Figura 05.

Certificación y especificaciones del aceite esencial de *syzygium aromaticum* (clavo de olor) de Aromas del Perú.

AROMAS DEL PERÚ SA - RUC. 20100459672

PROPIEDADES CROMATOGRÁFICAS	
EUGENOL	Mín. 80.00 %

COMPOSICIÓN:

IDENTIFICADORES	NOMBRE	CONCENTRACIÓN
N. CAS: 87-44-5 N. CE: 201-746-1	beta-carofileno	10 - 25 %
N. CAS: 97-53-0 N. CE: 202-509-1	Eugenol	80 - 100 %

ESTATUS REGULATORIO
Clasificación según Reglamento CE N° 1334/2008: Preparación aromatizante.

VIDA MEDIA
24 Meses

ALMACENAJE
Almacenar en envases cerrados, en lugar seco y bien ventilado, protegido de la luz.

INFORMACIÓN DE SEGURIDAD
Su manipulación en principio no entraña peligros, no obstante se recomienda seguir las normas habituales en el manejo de productos químicos. Evítese el contacto con los ojos. Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. Conservar en envase bien cerrado y protegido de la luz, a temperatura ambiente.

IFRA: Los productos están fabricados según las recomendaciones de la IFRA - International Fragrance Association. 39th Amendment, abril 2005- y la RIFM

INFORMACION ADICIONAL:
Los datos expresados en esta información, reproducen los facilitados por nuestro proveedor y/o los obtenidos en el laboratorio de control, sin que en ningún caso amaran de los controles exigidos en cada sector. Esta información es una reproducción informatizada del original facilitado por nuestro distribuidor, responsable en Aromas del Perú.

21/10/2016 19:14

Figura 06.

Esquema de activación de bacteria *Streptococcus mutans* sp.

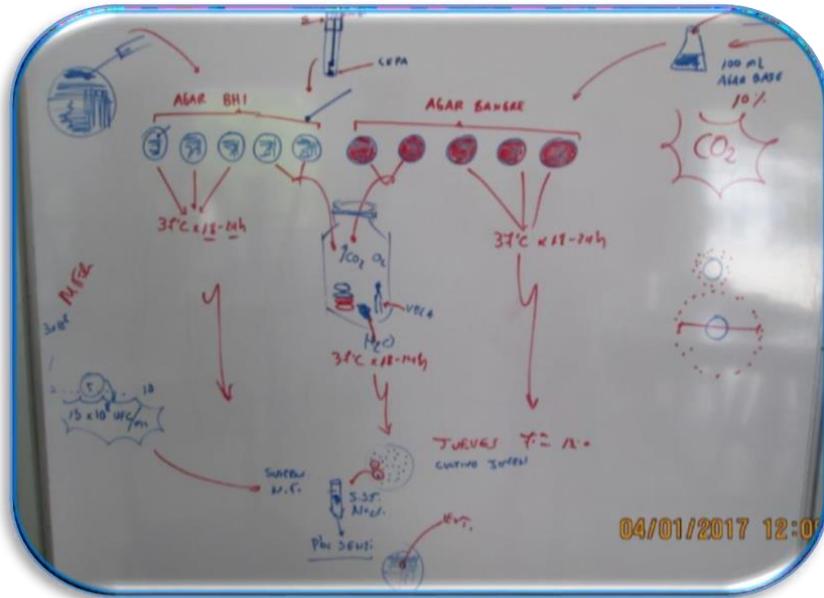


Figura 07.

Esterilización del material a emplear en el proceso de la tesis



Figura 08.

Preparación de mesa para sembrar la bacteria *Streptococcus mutans* sp.



Figura 09.

Activación de la bacteria *Streptococcus mutans* sp.



Figura 10.

Sembrado en las placas con agar sangre y agar medio de cultivo Brain Heart Infusion

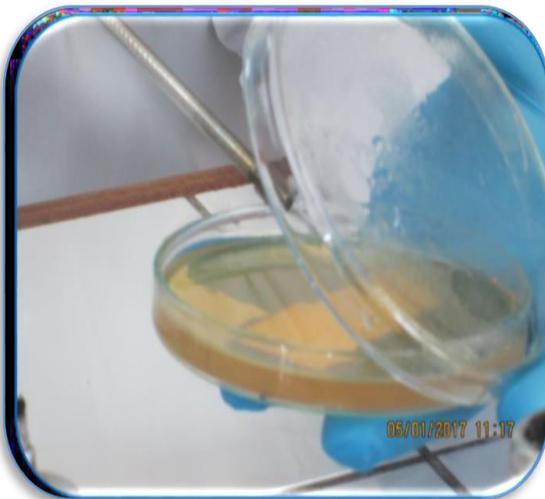


Figura 11.

Realizando la incubación que requería de una jarra para poder incubar bacterias *Streptococcus mutans* sp. que son anaerobios

