



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

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

Actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa patrón de  
*Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup> por acción de aceite  
esencial de *Lippia alba* (Pampa orégano).

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

**AUTOR:**

CORONEL ALVA JHONATAN

**ASESOR:**

Mgtr. ZEVALLOS ESCOBAR LIZ ELVA

**CHIMBOTE – PERÚ**

**2018**

## TÍTULO

Actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup> por acción de aceite esencial de *Lippia alba* (Pampa orégano).

# **JURADO EVALUADOR DE TESIS Y ASESOR**

.....  
**Dr. JORGE LUIS DIAZ ORTEGA**  
**PRESIDENTE**

.....  
**Mgtr. TEODORO WALTER RAMÍREZ ROMERO**  
**MIEMBRO**

.....  
**Mgtr. EDISON VASQUEZ CORALES**  
**MIEMBRO**

.....  
**Mgtr. LIZ ELVA ZEVALLOS ESCOBAR**  
**ASESOR**

## **DEDICATORIA.**

A mis padres Wilfredo & Hilda, a mi hijo Lían Yadiel y a todos mis hermanos, por su amor, su apoyo en todo momento y ánimo constante que siempre me ayuda a llegar más allá de donde me propongo, y con lo cual he podido dar el primer paso en mi carrera profesional.

## AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios por darme la vida, e iluminarme en este camino.

A la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote.

A la Facultad de Ciencias de la Salud.

A mi querida Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a su Directora Mgtr. Q.F

María Isabel Palacios Palacios por apoyarnos en todo momento.

A mi asesora de tesis, Mgtr. Q.F Liz E. Zevallos Escobar, por su incondicional apoyo, y compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación y hacer posible esta investigación.

A mis padres, por su apoyo en todo sentido, por darme su confianza, por enseñarme desde pequeño todos sus valores, por sus duros esfuerzos y el amor que siempre me han  
dado

A mi hermosa pareja de vida y madre de mi hijo Lían “Evelyn” por su apoyo incondicional en todo momento, a mis Hermanos, por sus consejos, los ánimos y por su  
apoyo.

A todas las personas que siempre estuvieron dándome ánimos y no perdieron la  
confianza en mí.

A todas las personas de la Escuela de Farmacia y Bioquímica que contribuyeron en mi  
formación profesional, a todos mis docentes.

## RESUMEN

Se determinó la actividad inhibitoria *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba* “pampa orégano” a diferentes concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% sobre la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™. Los ensayos consistieron en realizar distintas concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba*, diluyendo cada concentración en dimetilsulfoxido, un control positivo fue clorhexidina al 0,12% y el control negativo fue dimetilsulfoxido. Para evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lippia alba* se utilizó los parámetros de Duraffourd. Se embebieron discos de papel filtro con el aceite esencial a diferentes concentraciones y se determinó el efecto antibacteriano, la lectura de los halos de inhibición se determinó después de 48 horas midiendo el tamaño en milímetros. En las muestras el aceite esencial de *Lippia alba* al 100% obtuvo un promedio de 32.2 mm, aceite esencial de *Lippia alba* al 75 % obtuvo un promedio de 24.4 mm, aceite esencial de *Lippia alba* al 50 % obtuvo un promedio de 19.2 mm, aceite esencial de *Lippia alba* al 25 % obtuvo un promedio de 15.4 mm, el control positivo (Clorhexidina 0.12%) obtuvo un promedio de 14.1 mm y el control negativo DMSO 25 % no tuvo efecto inhibitorio del crecimiento sobre la cepa patrón. Se concluyó que el aceite esencial de *Lippia alba* (Pampa orégano) al 25% comparado con el control positivo (Clorhexidina 0.12%) presentó mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™.

**Palabras clave:** Antibacteriano, *Streptococcus mutans*, *Lippia alba*, Pampa orégano.

## ABSTRACT

The inhibitory activity in vitro of the essential oil of *Lippia alba* "pampa oregano" was determined at different concentrations 25%, 50%, 75% and 100% on the standard strain of *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM. The tests consisted in performing different concentrations of the essential oil of *Lippia alba*, diluting each concentration in dimethylsulfoxide, a positive control was 0.12% chlorhexidine and the negative control was dimethylsulfoxide. To evaluate the antibacterial effect of the essential oil of *Lippia alba*, Duraffourd parameters were used. Filtered paper discs were imbibed with the essential oil at different concentrations and the antibacterial effect was determined, the reading of the inhibition zones was determined after 48 hours by measuring the size in millimeters. In the samples the essential oil of *Lippia alba* at 100% obtained an average of 32.2 mm, essential oil of *Lippia alba* at 75% obtained an average of 24.4 mm, essential oil of *Lippia alba* at 50% obtained an average of 19.2 mm, oil Essential *Lippia alba* 25% obtained an average of 15.4 mm, the positive control (Chlorhexidine 0.12%) obtained an average of 14.1 mm and the negative control DMSO 25% had no inhibitory effect of growth on the stock strain. It was concluded that the essential oil of *Lippia alba* (Pampa oregano) at 100% compared to the positive control (Chlorhexidine 0.12%) presented greater inhibitory effect on the growth of the standard strain of *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM.

Key words: Antibacterial, *Streptococcus mutans*, *Lippia alba*, Pampa oregano.

# ÍNDICE

|  |     |
|--|-----|
| TÍTULO .....   | i   |
| JURADO EVALUADOR DE TESIS Y ASESOR.....  | ii  |
| DEDICATORIA.....   | iii |
| AGRADECIMIENTOS .....  | iv  |
| RESUMEN.....   | v   |
| ABSTRACT .....   | vi  |
| I. INTRODUCCIÓN .....  | 1   |
| II. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....  | 5   |
| 2.1 ANTECEDENTES .....   | 5   |
| 2.2 BASES TEÓRICAS .....   | 9   |
| III. HIPÓTESIS.....  | 24  |
| IV. METODOLOGÍA .....  | 25  |
| 4.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....  | 25  |
| 4.1.2. Identificación taxonómica y certificación .....   | 26  |
| 4.1.3. Obtención del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (pampa orégano) .....   | 26  |
| 4.1.4. Disolución del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (pampa orégano).....   | 27  |
| 4.1.5. Inhibición de la cepa bacteriana .....  | 28  |
| 4.1.6. Reactivación de la cepa bacteriana <i>streptococcus mutans atcc®25175</i> .....   | 28  |
| 4.1.7. Estandarización de la cepa patrón <i>Streptococcus mutans</i> .....   | 28  |
| 4.1.8. Prueba de inhibición del crecimiento bacteriano del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (pampa orégano) frente a la cepa patrón de <i>Streptococcus mutans ATCC®25173</i> <sup>TM</sup> .<br>29 |     |
| 4.1.9. Evaluación del efecto antibacteriano.....   | 29  |
| 4.1.10. Prueba de acción antibacteriana.....   | 30  |
| 4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.....  | 30  |
| 4.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES .....   | 30  |
| 4.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....   | 31  |
| 4.5. PLAN DE ANÁLISIS. ....  | 32  |
| 4.6. MATRIZ DE CONSISTENCIA. ....  | 32  |
| 4.7. PRINCIPIOS ÉTICOS.....  | 34  |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>V. RESULTADOS.....</b>                | <b>35</b> |
| <b>5.1. RESULTADOS.....</b>              | <b>35</b> |
| <b>5.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....</b> | <b>39</b> |
| <b>VI. CONCLUSIONES.....</b>             | <b>43</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....</b>  | <b>44</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>TABLA 1.</b> Actividad inhibitoria del crecimiento sobre la cepa <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM por efecto del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (pampa orégano) a diferentes concentraciones | 49 |
| <b>TABLA 2.</b> Tamaño de halos de inhibición en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> después de aplicar aceite esencial de <i>Lippia alba</i> al 25%, 50%, 75% y 100%   | 50 |
| <b>TABLA 3.</b> Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> 25%, 50%, 75% y 100% en cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM según escala de Duraffourd                           | 51 |

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

**GRÁFICO 1.** Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Lippia alba* 25%, 50%, 75% y 100% en cepas de *Streptococcus mutan* ATCC®25175™ según escala de Duraffourd.

52

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Certificación de <i>Lippia alba</i> por la Universidad Nacional de Trujillo “Herbarium truxillense (HUT)”.   | 66 |
| <b>Figura 2.</b> Recolección de hojas de <i>Lippia alba</i> (pampa orégano).  | 66 |
| <b>Figura 3.</b> Deshidratación de <i>Lippia alba</i> , en estufa a 40 °C.  | 67 |
| <b>Figura 4.</b> Cortando <i>Lippia alba</i> para obtener aceite esencial en equipo Clevenger.  | 67 |
| <b>Figura 5.</b> Colocando <i>Lippia alba</i> troceada en equipo Clevenger.   | 68 |
| <b>Figura 6.</b> Obteniendo aceite esencial de <i>Lippia alba</i> por medio de equipo Clevenger.  | 68 |
| <b>Figura 7.</b> Aceite obtenido de <i>Lippia alba</i> .  | 69 |
| <b>Figura 8.</b> Preparación medio de cultivo de <i>Streptococcus mutans</i> .  | 69 |
| <b>Figura 9.</b> Esterilización de medio de cultivo para siembra de <i>Streptococcus mutans</i> .   | 70 |
| <b>Figura 10.</b> Siembra realizada, inhibiendo el crecimiento de cepa patrón de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175 <sup>TM</sup> , por aceite esencial de <i>Lippia alba</i> a diferentes concentraciones en anaerobiosis. | 70 |
| <b>Figura 11.</b> Halos de inhibición de cepa patrón de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175 <sup>TM</sup> por aceite esencial a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%.   | 71 |
| <b>Figura 12.</b> Halo de inhibición de cepa patrón de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175 <sup>TM</sup> por control positivo Clorhexidina 0.12%   | 71 |

**Figura 13.** Placas de inhibición del crecimiento de cepa patrón de *Streptococcus mutans* por aceite esencial de *Lippia alba*. 72

**Figura 14.** Observación morfológica de cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>, por tinción Gram. 72

## ÍNDICE DE ANEXOS

**ANEXO 1.** TABLA DE RECOLECCION DE DATOS PARA LA MEDIDA DE  
LOS HALOS DE INHIBICION SOBRE LA CEPA PATRON DE *Streptococcus*  
*mutans* ATCC®25175TM

**73**

## I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de salud más prevalente a nivel mundial es la caries dental, el cual intervienen múltiples factores como placas dentarias, saliva, dientes susceptibles, cantidad de sustrato suficiente para su multiplicación, etc. La caries se caracteriza por destruir los tejidos duros del diente con una desmineralización creando una cavidad, posteriormente se genera la pérdida del mismo. El agente causal con mayor frecuencia es una bacteria perteneciente a la familia de los *Streptococcus* grupo *mutans streptococci* (*Streptococcus mutans*)<sup>1,2,3</sup>.

La bacteria “*Streptococcus mutans* se caracteriza por ser cocos gram positivos”, anaerobios facultativos y “forma parte de la flora bacteriana de la cavidad bucal y vías respiratorias altas”.<sup>2</sup> “Entre los factores de patogenicidad en el *Streptococcus mutans* destaca: poder acidogenico y acidúrico; síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insoluble y solubles, fructanos; síntesis de polisacáridos intracelulares; capacidad adhesiva por las proteínas salivales; producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos”.<sup>1,2</sup>

Actualmente existen muchos métodos para prevenir y tratar este problema de salud dental, generalmente estos métodos consisten en utilizar productos antimicrobianos químicos, estos productos químicos a largo plazo generan daños en el organismo ya que su uso prolongado causa resistencia bacteriana e inmunodepresión. Por otro lado, este problema de salud genera problemas en la economía ya que requiere de una inversión personal, gasto de tiempo para acudir a un profesional Odontólogo dejando de lado otros quehaceres como el estudio, trabajo, oficios en el hogar, etc.<sup>3</sup>

En nuestra actualidad los estudios con distintas plantas vienen generando una expectativa diferente ya que se ha regresado a usar plantas como antiguamente nuestros antepasados lo venían haciendo, para combatir diferentes microorganismos patógenos y están siendo recibidos con mucha atención por los científicos, comprobándose diversas propiedades curativas.<sup>3,4</sup>

Hoy en día se vienen empleando diversas plantas medicinales para combatir distintas enfermedades, una de estas plantas es el “pampa orégano” *Lippia alba*.<sup>4</sup>

*Lippia alba* (Mill) N.E Brown, conocida, comúnmente como “Cidron”, “hierba luisa” (Venezuela), “erva-cidreira” (Brasil), “prontoalivio” (Colombia), es usada en Latinoamérica como antidiarreico, antiespasmódico, diaforético, diurético, expectorante, laxante y sedante<sup>5</sup>. En el Perú esta planta esta planta es conocida por sus diversas propiedades curativas.

Estudios publicados por la Revista Cubana de Farmacia, sobre la composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) NE. Brown. Llegaron a la conclusión de que el “aceite esencial de *Lippia alba* presenta actividad antibacteriana”, siendo mayor, en general, sobre los gérmenes Gram positivos, el cual podría ser por su alto contenido en carvona<sup>6</sup>.

Sabemos que la bacteria involucrada en la formación de caries es el *Streptococcus mutans*, y por tal se han diseñado múltiples medidas de prevención y de erradicación de esta bacteria empleándose diversos productos antimicrobianos, antisépticos y diversas formas de profilaxis usandose colutorios, pastas dentales, etc, pero su uso a largo plazo



genera problemas con el ecosistema bacteriano oral, ya que se produce resistencia bacteriana e inmunodepresión <sup>8,9</sup>.

En la actualidad las plantas ocupan un rol muy importante dentro de la población ya que estas son usadas para aliviar diversos problemas de salud y es de fácil acceso y no requiere de una economía costosa, las plantas han venido siendo utilizadas hace siglos atrás por nuestros antepasados, pero con el paso del tiempo y el éxito de los medicamentos habían sido olvidadas, pero hoy por hoy, nuevamente están siendo estudiadas por los científicos y usadas por la comunidad, un ejemplo de esto es el aceite esencial de *Lippia alba* el cual tiene múltiples beneficios en distintos países para aliviar diversos males pero su posible uso como antimicrobiano en la principal bacteria involucrada en la formación de caries no reúnen referencias.<sup>7,9</sup>

En afinidad con estas observaciones; “el objetivo de la presente investigación fue comprobar el efecto inhibitorio del crecimiento de *Streptococcus mutans*” por acción de aceite esencial de *Lippia alba* “pampa orégano” a diferentes concentraciones.

### **Formulación del problema**

¿”Cuál es la actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM frente al aceite esencial” de *Lippia alba* “pampa orégano” a diferentes concentraciones?

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar la actividad inhibitoria del crecimiento cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ frente al aceite esencial de *Lippia alba* “pampa orégano” a diferentes concentraciones.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* del aceite esencial de *Lippia alba* a las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100%.
2. Determinar el tamaño del halo de inhibición de crecimiento bacteriano *in vitro* de la cepa patrón *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ en los discos embebidos a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano).

## II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2.1 ANTECEDENTES

**Gomes** et al. En el **2010** realizó un estudio sobre la composición química y evaluación de la actividad antiherpética in vitro de aceites esenciales de *Lippia alba* y sus componentes mayoritarios, evaluaron la “actividad antiviral in vitro empleando la técnica modificada, de titulación del punto final (EPTT)”, donde se determinó por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), la composición química de veinte aceites esenciales de *Lippia alba*, en donde se identificó dos quimiotipos: citral y carvona. Los resultados que obtuvieron fueron: “los aceites quimiotipo carvona, BC<sub>1</sub> y CA<sub>2</sub>, mostraron actividad antiherpética in vitro, moderada sobre monocapa de células Hela infectadas, con valores de Rf de  $1 \times 10^{1,5}$ , en concentraciones de 250ug/ml y 125ug/ml, respectivamente.<sup>5</sup>

Sandra C. et al, realizaron un estudio sobre la actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*. Dan a conocer que el “aceite esencial” de *Lippia alba* demostró “actividad antibacteriana” en especial contra gérmenes Gram positivos, con valores de las concentraciones inhibitorias mínimas entre 0,3 y 0.63 mg/ml. Los extractos alcohólicos (etanólico y metanólico) de las raíces de *Lippia alba* mostraron actividad bactericida contra las cepas de *Stapylococcus aureus* (ATCC 6538P, ATCC 6538), *Klebisiella pseudomoniam* (ATCC 10031). Los aceites esenciales de *Lippia alba* mostraron actividad inhibitoria del crecimiento de las cepas de *C. albicans* (ATCC 14053), *S. aureus* (ATCC 6538) y *E. Coli* (ATCC 25992). Los

extractos clorofórmicos, acetonicos, etanolicos de la raíz de *Lippia alba* mostraron actividad antimicrobiana in vitro (por la técnica de disco de papel) contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Mucobacterium smegmatis*, *Candida albicans*, *Monilla sitophila*. El extracto etanólico de *Lippia alba* sirve como antibacteriano (inhibe el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*) y antimicótico (*Arpergillus Níger*). Concluyen por primera vez haciendo un reporte sobre el efecto inhibitorio de in vitro del extracto acuoso de *Lippia alba* sobre el crecimiento de *H. pylori*<sup>7</sup>.

Glauce et al. Reportaron actividad analgésica sobre el “modelo de plato caliente y formalina” en dos de los quimiotipos del aceite esencial de *Lippia alba*, en la cual se demostraron que los dos quimiotipos (citrinal y carvona) presentaron actividad analgésica altamente significativa, no encontrándose una diferencia esclarecida en los tiempos de latencia para ambos aceites<sup>8</sup>.

Vale et al. Realizaron un estudio del efecto el aceite esencial de *Lippia alba*, sobre el comportamiento de animales que son tratados en experimentación, usando para esto tres quimiotipos (carvona, mirreno, limoneno). Tras la utilización del aceite esencial sobre los animales de experimentación, se observó que dicho aceite aumentó el tiempo de “permanencia de los animales en las zonas abiertas del laberinto”, agregando a este estudio el aceite de dicha planta produjo un “efecto sedante”, como también efecto anti estrés, por otro lado el aceite esencial de *Lippia alba* disminuyó la temperatura rectal de los animales. Se concluyó que los aceites esenciales de *Lippia alba* posee actividad “anti estrés, sedativo y antipirético”<sup>9</sup>.

Hatno et al. En el 2012, hicieron una investigación para determinar la efectividad del “uso tradicional” de *Lippia alba* como ansiolítico, hallándose que el aceite de dicha planta posee propiedades idénticas a los ansiolíticos como el diazepam <sup>10</sup>.

Abad et al. Realizaron un estudio de la “actividad antiviral” de diversas drogas, sobre “*Herpes simplex* tipo I”, en donde dieron a demostrar que *Lippia alba*, tiene un alto grado de efecto inhibitorio sobre el virus del herpes, además se demuestra “actividad antimutagenica” de la especie actuando por la “via de los antioxidantes”. Dentro de los compuestos químicos relacionados a la actividad se encuentra el eudesmol <sup>11</sup>.

Parodi et al. Determinaron que el eugenol y el aceite esencial de *Lippia alba* presentan actividad anestésica en larvas de *Litopenaeus vannamei* (crustáceo); además se determinó la “actividad antioxidante”, demostrándose que los dos compuestos (eugenol y aceite) son activos <sup>12</sup>.

En el 2004, Zétola et al. Reportaron la actividad sedativa y relajante del “extracto etanólico de hojas” de *Lippia alba*, fuera de “compuestos volátiles”. En el mismo estudio se encontraron una elevada concentración de flavonoides, el cual es bastante común para esta especie <sup>13</sup>.

Gerrero et al. Realizaron un estudio del extracto etanólico de distintas plantas usando partes aéreas del vegetal, en las cuales se incluyó a *Lippia alba*. Se realizaron ensayos in-vivo usando ratas, donde, se muestran que los extractos etanolicos de las plantas presentaron “actividad antihipertensiva y vasodilatadora” <sup>14</sup>.

Filho et al. Realizaron un estudio en el 2006, de los extractos de acetato de etilo metanol y acuoso de raíces de *Lippia alba*, sobre bacterias Gram (+) y Gram (-), haciendo uso de la “técnica de difusión en pozo”; obtuvieron resultados activos solo los extractos de acetato de etilo y metanol sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), (ATCC 6538) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). En esta misma investigación se identificó presencia de “terpenoides, fenilpropanoides y azúcares”<sup>15</sup>.

Ara et al. Reportaron actividad antimicrobiana, antifúngica y actividad citotóxica de las hojas y flores *in vitro* de *Lippia alba*. Usando el “método de difusión en disco”, revelaron que los extractos analizados tienen alta actividad inhibitoria del crecimiento de todas las cepas Gram (+) y Gram (-) usadas en el estudio, además, los extractos presentan mediana actividad antifúngica y efecto citotóxico leve<sup>16</sup>.

**Cosco**, realizó un estudio sobre la actividad inhibitoria de *Streptococcus mutans* y la flora mixta salival, en donde uso como método “concentraciones diferentes del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” y un grupo control clorhexidina 0.12%”, donde midiendo los “halos de inhibición formados alrededor de los discos filtros embebidos con cada una de las concentraciones sobre la flora mixta salival, cepa aislada del grupo mutans de la flora mixta salival y cepa patrón *Streptococcus mutans*”, obtuvo los siguientes resultados: “las concentraciones de 25%, 50% y 100% del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” presentaron “efecto inhibitorio positivo en cultivos de flora mixta salival, cepa aislada del grupo mutans de la flora mixta salival y cepa patrón de *Streptococcus mutans*, el grupo control clorhexidina 0.12% mostró mayor efecto inhibitorio sobre las tres concentraciones en los grupos de

estudio evaluados con excepción de la concentración del 100% el cual mostró diferencia estadísticamente significativa con el grupo control clorhexidina 0.12% sobre la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™<sup>17</sup>.

Durán et al, en el 2007 en Colombia “realizaron un estudio comparativo” de la composición química de “aceites esenciales” de *Lippia alba* proveniente de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. En donde señalan que en el análisis comparativo se revelaron 3 “quimiotipos” uno rico en carvona (ca. 41%), otro rico en citral (neral + geranial ca 55%) y el tercero, un quimiotipo híbrido, compuesto por carvona (25%), limoneno (22%) y citral (21%)<sup>18</sup>.

Un estudio Realizado en el 2014, sobre la actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia Alba* sobre *Tribolium castaneum* Hersbt, en granos de trigo; registraron la mortalidad de *Tribolium castaneum* Hersbt a las 24 horas, tras utilizar el quimiotipo carvona-limoneno del aceite esencial de *Lippia alba* a una concentración de 52 µL L-1 de aire sobre adultos de *T. Castaneum*<sup>19</sup>.

## **2.2 BASES TEÓRICAS**

### ***Lippia alba* (Pampa Orégano)**

#### **Clasificación Botánica<sup>20, 21</sup>.**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: Lippia

N. Especie: alba (Mill) N.E1Br.

N. Científico: *Lippia alba*

### **Características**

*Lippia* es un género botánico de plantas con flores con unas 500 especies pertenecientes a la familia de las verbenáceas.

### **Descripción taxonómica**

*Lippia alba*. Es un arbusto muy ramificado dicotómicamente, de 1 m a 2 m de alto, olor aromático característico. Hojas elípticas a redondeado-ovaladas, opuestas y terminales, agudas u obtusas, crenadas, más o menos rugosas, canescentes, tomentosas, vellosas en la parte inferior, aserradas en el margen, ligeramente escabrosas en la superficie, de color verde ceniza, de 6cm de largo y 2.5 cm de ancho. Flores zigomorfas, hermafroditas en espigas al inicio subglobosas, con corola lila y blanca con fondo amarillo; cáliz villosos, de casi 2 mm de largo, bidentado. Fruto drupa o capsula seca con exocarpo membranoso de color violeta oscuro que se separa al final en dos nuecillas. Raíz axial, fasciculada, de más o menos 25 cm de largo<sup>20, 21</sup>.



## **Distribución y Hábitat**

*Lippia alba* crece hasta 1800 msnm, se encuentra en bosques húmedos subtropicales templados, bosque seco tropical, bosque húmedo montado bajo subtropical y bosque muy húmedo subtropical cálido. La especie se distribuye desde México, y por el Caribe (Haití, Cuba, República Dominicana, Jamaica e islas Leeward) hasta Argentina y la Amazonia, también se encuentra en Suráfrica<sup>20, 21</sup>.

En estado silvestre se le encuentra en laderas, a la orilla de caminos y ribera de ríos; comúnmente se encuentra cultivada en patios y jardines<sup>21</sup>.

## **Usos**

La infusión de las hojas y la inflorescencia se ha empleado como sedante gastrointestinal, antidiarreico, sudorífico, expectorante, emenagogo y en tratamiento de diabetes. Las hojas también se usan para la hemorroide, para inducir el sueño, contra enfermedades venéreas, afecciones de la piel y mucosas, flujo vaginal, goma, artritis, dolores musculares y de muelas; las hojas también tienen propiedades antisépticas, antifúngicas y antibacteriales<sup>21, 22, 23</sup>.

## **Sinonimias<sup>23</sup>**

### **Sinónimos de *Lippia alba***

*Lantana alba*

*Lantana lavandulacea*

*Lantana geminata*

*Lantana habannensis*

*Lanata mollisima*

*Lippia panamensis*

*Lippia asperifolia*

*Verbena odorata*

*Lippia citrato*

*Zaponia glofiflora*

*Lippia crenata*

*Zaponia odorata*

*Lippia geminata*

### **Nombres comunes**

Argentina

Salvia

Brasil

Eva cidreira, alecrim do campo, falsa melisa.

Colombia

Pronto alivio

Costa Rica

Juanilama

Guatemala

Salvia sija

Panamá

Mastrato

Perú

Cidra pampa orégano

Uruguay

Salvia trepadora.

### **Componentes químicos de los aceites esenciales de *Lippia alba***

Autores señalan que los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia alba* son: Limoneno 26%, Neral 10%, Carvona 40%, Piperitona 3.62%, Geranial 13%,

Piperitenona 8.26%. El aceite esencial de *Lippia alba* está compuesto principalmente por dos tipos de compuestos químicos, los terpenoides y los fenilpropanoides <sup>6,21</sup>.

Otros autores indican que los aceites esenciales de esta planta con mayor relevancia en cuanto a su composición son: “citral, limoneno, mircineno, 1.8-cinero, piperitona, alfa-terpineno, germacreno y el linalool. Por otro lado, la composición y la concentración de los compuestos químicos de *Lippia alba*, dependerá del lugar de cultivo y recolección de la planta <sup>24</sup>.

Algunos estudios evidencian que los aceites esenciales de *Lippia alba* son “farmacológicamente activos”, de los cuales el linalool, citral y mirceno generan actividad sobre el SNC, provocando relajación muscular y somnolencia en animales de laboratorio <sup>24,25</sup>.

**Carvona:** se le conoce por su poder fungicida, insecticida y antibacterial. Los dos isómeros de la carvona, (S)-(+ y (R)-(-), se encuentran en la naturaleza. La (S)-(+)-carvona tiene aroma a alcaravea/eneldo. La (R)-(-)-carvona tiene aroma a hierbabuena<sup>26</sup>.

El quimiotipo carvona tiene una esencia rica en (-) carvona. Este tiene un mecanismo de acción que activa los canales de  $K^+$ , la cual genera una hiperpolarización resultante del flujo de  $K^+$  y reduce el influjo de  $Ca^{2+}$  frente a agonistas como la acetilcolina, contribuyendo al efecto espasmolítico <sup>27</sup>.

**Terpenoides:** constituyen la familia más diversa de productos naturales involucrados en numerosas funciones biológicas. Además de ser esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, los terpenoides también son eficaces como mediadores

ecológicos. Algunas especies acumulan fitoalexinas terpenoides en respuesta al ataque de plagas<sup>28</sup>.

**Fenilpropanoides:** están relacionados estructuralmente con los aminoácidos fenilalanina y tirosina, pero muchos de ellos derivan de la ruta del ácido Shikimico. Su nombre deriva por su esqueleto, el fenilpropano<sup>29</sup>.

### **Mecanismo de acción de los aceites esenciales “sobre los microorganismos”.**

“Este mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y todavía no ha sido del entero entendido y explicado. El mecanismo de acción de los aceites esenciales dependerá de la muestra de microorganismos y esta principalmente relacionado con el esqueleto de la pared citológica y la membrana externa de los mismos”<sup>29</sup>.

### **¿Qué son los aceites esenciales?**

Son mezclas de compuestos orgánicos constituidas químicamente por metabolitos secundarios de la planta como son: compuestos aromáticos, sesquiterpenos, terpenos, etc. Las cuales estas se encuentran en órganos distintos de la planta como las hojas, flores y frutos y estas se obtienen por diferentes métodos y técnicas dependiendo de la situación de la planta. Los aceites esenciales son solubles en son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos, “los aceites esenciales se caracterizan por su aroma, consistencia, índice de refracción y rotación óptica”. Para estudios cualitativos se recurre generalmente a la “cromatografía gaseosa”. Siendo los aceites esenciales una mezcla natural de terpenos, su composición química es distinta y muy variada por lo que no existe una reacción de identificación general para los mismos, aunque se pueden realizar

reacciones de reconocimiento de grupos funcionales tales como las de alcoholes, aldehídos, cetona, fenoles, etc. Por otro lado la composición de los aceites esenciales de la planta dependerá del lugar de recolección de la droga como también la época.<sup>17, 30</sup>

### **Extracción y purificación de los aceites esenciales.**

Los aceites esenciales se obtienen por diversos métodos, son muy volátiles y la técnica dependerá del estado de la planta, a continuación se explican dos técnicas:

#### **a. Técnica de arrastre de vapor**

Los aceites esenciales poseen comúnmente puntos de ebullición altos y son insolubles en agua, no obstante, se pueden apartar de su fuente natural usando el punto de ebullición del agua. Desde el punto de vista fisicoquímico, este hecho se puede explicar así: cuando coexisten dos líquidos en un recipiente abierto a la atmósfera, uno y otro contribuyen a la presión parcial sobre la superficie de los líquidos. Al incrementar la calentura, la fuerza de vapor sobre la superficie del líquido aumentará, debido a que se incrementa el número de moléculas que pasan al estado de vapor.<sup>17</sup>

#### **b. Destilación de aceites esenciales por arrastre de vapor de agua**

Se puede seleccionar esta técnica cuando se trata de plantas frescas. Se recolecta la parte útil de la planta y se coloca en el equipo extractora de aceite esencial. “No es necesario en este caso realizar una extracción previa, porque el material vegetal aún no ha perdido su humedad natural”. Se coloca agua suficiente en el balón y se lleva a calentura hasta ebullición, “el vapor que atraviesa por la cámara arrastrando el aceite esencial pasará, por una zona refrigerante que condensará el aceite esencial y el agua. Durante la destilación ciertos componentes de los aceites esenciales tienden a hidrolizarse, mientras

que otros se descomponen con elevada temperatura. Es por eso que la condensación con vapor directo es excelente dado que permite la máxima propagación viable del vapor de agua a través de las membranas vegetales, reduciendo al mínimo la hidrólisis y la destrucción de sus enlaces químicos”<sup>17</sup>

### **“Rendimiento de aceite esencial”<sup>17</sup>**

El rendimiento de aceite esencial realiza con la cantidad de volumen de destilado del aceite esencial obtenido en la probeta florentino. Por el método gravimétrico volumétrico se determina el Porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial (%RAE) con la siguiente expresión:

$$\%RAE = \text{Vol. AE (mL)} / \text{Pmuestra (g)} \times 100$$

Dónde:

Vol. AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P muestra: Peso de la muestra a destilar en gramos.

## **MICROORGANISMOS QUE ALBERGAN EN LA CAVIDAD ORAL**

### **Generalidades:**

En la cavidad oral albergan “innumerables microorganismos en un ecosistema” de diversidad inmensa que aún no ha sido puesto en claro en su conjunto y está lejos de ser entendido en toda su magnitud<sup>17, 31</sup>. La cavidad bucal es muy compleja,

aproximadamente existen más de 700 especies que habitan o transitan por ella. Algunas de ellas son causantes de patologías de alta incidencia, así como caries o enfermedades periodontales <sup>30</sup>. Recientemente, la cavidad oral “se consideraba como un hábitat sencillo para los microorganismos”, pero actualmente “se reconoce que los dientes, el surco gingival, la lengua, otras superficies mucosas y la saliva, todos forman hábitat o sitios distintos donde los microorganismos se propagan y aumentan”. Los microorganismos en la cavidad oral tienen sus propios espacios en los cuales pueden sobrevivir y multiplicarse de acuerdo a su especie, esto dependerá del tipo de sustrato indispensable para su supervivencia. <sup>17, 31</sup>

## **DESARROLLO Y MULTIPLICACION DE LA FLORA ORAL.**

### **a. Adherencia y multiplicación.**

Algunos microorganismos como bacterias, tienen habilidades de adherirse a diferentes zonas de la cavidad oral, como las mejillas, paladar y lengua, “*Streptococcus mutans* y *sanguis* se adhieren al esmalte dental debido a la producción de polisacárido extracelular por la bacteria”. Para la multiplicación bacteriana en la zona bucal, las bacterias deben “permanecer como parte” de la flora oral, “una bacteria debe ser capaz de multiplicarse en el sitio particular en que puede ser retenido”. Este fenómeno depende de múltiples factores <sup>17, 31, 32</sup>.

### **b. Sustratos para supervivencia microbiana.**

Las bacterias tienen que tener capacidad de metabolizar los sustratos que están disponibles a partir de los alimentos o productos metabolizados de otras bacterias

vecinas y así poder colonizar. Son muchos los factores que contribuyen a la proliferación de los microorganismos en la cavidad bucal como son: el pH, el consumo excesivo de carbohidratos, la cual incrementa el número creciente de bacterias en particular *Streptococcus mutans*.<sup>17,31,</sup>

### **Flora bacteriana en la cavidad oral**

La flora en la cavidad oral es compleja, ya que cada espacio tiene su propia población microbiana; en los labios predominan el *Staphylococcus albus* y los *micrococos cutáneos* con abundantes cantidades de *estreptococos* típicos de la boca, también podemos encontrar *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. En la mejilla la bacteria que predomina es *Sireplococcus miliar*: le siguen en frecuencia *Streptococcus sanguis* y *salivarius*., También podemos encontrar *Haemophilus influenzae* y la especie *Neisseria*. El paladar también tiene su propia colonia en donde albergan hemofilos, lactobacilos y levaduras Además, en estas zonas albergan organismos respiratorios microscópicos como *Haemophilus*, *Corynebaclerium*, *Neisseria* y *Branhamella*. En la lengua albergan distintos pipos de microorganismos pero la especie que predomina este espacio es el *Streptococcus salivarius*, y representa 20-50% de la flora total, el *Streptococcus mitis* también esta colonizada por *Candida albicans*. En el Surco gingival la flora bacteriana es muy variada

con 1000-1011 microorganismos por cada gramo de peso húmedo de los “residuos gingivales”. En los dientes encontramos una población bacteriana variada, pero la bacteria predominante es el *Streptococcus mutans*, como también *Streptococcus bucal*,



bacilos, fibras grampositivos y algunos anaerobios gramnegativos están constantemente presentes<sup>17,31,32,33</sup>.

### ***Streptococcus mutans***

Clarke en 1924, por primera vez aisló “microorganismos a partir de caries” dental a los cuales los denominó “estreptococos mutantes”, porque con “la coloración Gram se observaban las bacterias de forma más ovalada que redondeada, la cuál es la forma típica de los estreptococos, por lo que Clarke consideró que estas bacterias eran mutantes a este género”, pero no fue mencionado como una especie independiente sino hasta la 8° edición de *Bergey*.<sup>4, 17</sup>

El principal hábitat del *Streptococcus mutans* es la superficie dentaria de las personas, pero también pueden ser identificados en las partes posteriores de la cavidad oral. “Su presencia en placa bacteriana se ve reflejada por el alto nivel de sacarosa” a partir de los alimentos.<sup>17</sup>

Si observamos la estructura general de todos los *streptococcus*, *Streptococcus mutans* no difiere del modelo general salvo en la ausencia de cápsula, polisacárido C, complejos fibrilares y las fimbrias que cuando existen, no son muy prominentes. Si no por el contrario, en la pared celular destacan proteínas dotadas de diversas funciones, y polisacáridos, distintos del C. Estos polisacáridos muestran distintas especificidades antigénicas, lo que permite distinguir los serotipos a, b, c, d, e, f, g y h<sup>17,32</sup>.

*Streptococcus mutans* sobrevive y se desarrolla en un pH neutro, son acidúricos por sintetizar ácidos a pesar de sobrevivir en un medio neutro y acidogénicos por

metabolizar azúcares a ácidos. Esta bacteria alcanza muy rápido el pH ácido el cual es indispensable para iniciar el proceso de desmineralización. *Streptococcus mutans* sintetiza ácido láctico la cual es muy importante para su virulencia e iniciar el proceso de desmineralización del diente.<sup>32</sup>

### **Clasificación de *Streptococcus mutans***

Los *Streptococcus mutans* “son genéticamente heterogéneos y pueden ser divididos en distintos tipos. Esto ha sido posible por medio del estudio de estructuras antigénicas que permiten reconocer hasta 8 serotipos, designados por letras que van de la **A** a la **H**. esta subdivisión puede ser confirmada por otros estudios, tales como el análisis de la pared celular, electroforesis en gel de poliacrilamida o proteínas a partir de células completas, exámenes de las bases de ADN (porcentaje de guanina-citosina) y estudios de hibridación del ADN”. Estos serotipos se diferencian fisiológicamente ya que la fermentación y la hidrolización de azúcares es distinta, las cuales pueden ser considerados en otras subespecies o especies.<sup>31, 33</sup>

“El *Streptococcus mutans* puede ser asimilado por los serotipos c, e, f mientras los restantes han sido ubicados en las siguientes especies”:

“*Streptococcus cricetus* (serotipo a)”

“*Streptococcus rattus* (serotipo b)”

“*Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g)”

“*Streptococcus ferus* (serotipo c)”

“*Streptococcus macacae* (serotipo h)”

“*Streptococcus downei* (serotipo h)”

Las especies o serotipos de esta bacteria varía en distintas partes del mundo. “El serotipo c es común en Europa y América del Norte, mientras que el serotipo b es frecuente en África del Norte”. El motivo de la variación de estos serotipos es desconocida y no todos los serotipos son igualmente eficaces en la generación de caries dental en animales de estudio.<sup>17</sup>

La especie de *Streptococcus mutans* más prevalente en el mundo son los serotipos c, e y f, el cual están presentes en el 90% de las personas en el mundo. Los *Streptococcus mutans* pueden generar polímeros extracelulares solubles (dextranos y fructanos) e insolubles (mutanos) a partir de la azúcares como la sacarosa. Los polímeros insolubles es muy importante para la adhesión del *Streptococcus mutans* a la superficie de los dientes.<sup>17, 32</sup>

### **Metabolismo de la Sacarosa**

Uno de los sustratos más importante para estas bacterias, con respecto a su función como agente causal de la caries, es el azúcar sacarosa. “De su metabolización deriva la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares”. El *Streptococcus mutans* en presencia del azúcar de sacarosa produce una molécula de glucano extracelular, polímero de la glucosa, la cual permite adherirse a la superficie de los dientes generando así una placa bacteriana el cual será un foco de caries. La bacteria utiliza solo una mínima porción del azúcar de sacarosa para formar polisacáridos extracelulares e intracelulares; la mayor parte de ella es empleado “como fuente energética para el desarrollo” de los mismos.<sup>17, 32, 33</sup>

## **Cultivo**

*Streptococcus mutans* es una bacteria anaerobio facultativo. Sobrevive a una temperatura de 37 °C y un pH neutro y teniendo en cuenta estas consideraciones los medios de cultivos para dicha bacteria son recomendadas las siguientes:

Como medio poco selectivo puede utilizarse MSA (mitis salivarius agar) que contiene un 5 por 100 de sacarosa y como sustancias inhibidoras, telurito potásico, azul tripán y cristal violeta. Como medio más selectivo es MSB (mitis salivarius -bacitracina), que es MSA al que se le añade 0,2 U/ml de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100. Este medio está considerado, por algunos investigadores como un inhibidor del serotipo a (*S.cricetus*); pese a que esta especie es poco frecuente en la cavidad bucal humana<sup>17,33</sup>.

## **Colonización Inicial por *Streptococcus mutans***

En el año 1980, el investigador Berkowitz et al dieron a conocer que la contaminación de cavidad oral de los niños por *Streptococcus mutans* se produce con mayor frecuencia en niños mayores de los “12 meses de edad”.<sup>5</sup> Unos años después, el investigador “Caufield et al en 1993” dieron a conocer que esto ocurre en mayor demanda a la “edad promedio de 26 meses” de edad. Sin embargo, autores como Mohan et al, en 1998 encontraron una “mayor colonización de *Streptococcus mutans* a partir de los 14 meses” de vida del infante; mientras que, “Mattos - Granner y col, en el 2001 encontraron en la población brasileña una mayor prevalencia de *Streptococcus mutans* en el 70.8% de infantes entre la edad de 12 y 19 meses”, dando a conocer también que es un factor de riesgo y que de acuerdo con los hábitos dietéticos, costumbres y grado de contaminación

de caries por parte de la familia, el riesgo será elevado o inferior. Hoy por hoy, “estudios clínicos más recientes han demostrado que los *Streptococcus mutans* pueden colonizar la cavidad oral de los niños predestados. “Los surcos de la lengua parecen ser el espacio ecológico más importante”<sup>17</sup>.

### **Asociación entre Caries y la bacteria *Streptococcus mutans***

El problema de la caries dental ha sido entendido como un “estado dinámico de desmineralización - remineralización que se genera como producto del metabolismo las bacterias” implicadas en su producción sobre la superficie de los dientes y que con el paso del tiempo determina la pérdida de mineral dentario y posteriormente, la aparición de un orificio en el diente.<sup>17</sup>

Muchas investigaciones han dado a conocer que la bacteria de *Streptococcus mutans* tiene relación con la placa bacteriana de caries. Por lo general en la saliva hay un incremento significativo de estas colonias de bacterias previo a la formación de la caries dental.<sup>17</sup>

En muchos estudios se observa que “la prevalencia de caries dental va en aumento de acuerdo edad”. En los infantes inferiores de 12 meses de edad está por debajo del 10%; de igual forma, entre los 36 meses de edad está en el 50%.<sup>10</sup> Cuanto más rápido ocurre la colonización por *Streptococcus mutans* aumenta la probabilidad de multiplicación cariogénica.<sup>33</sup>

### **III. HIPÓTESIS.**

La presente investigación tiene una hipótesis Implícita.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **4.1.1. Materiales y reactivos**

##### **a. Materiales y equipos para extraer el aceite esencial:**

- Hojas de *Lippia alba* “pampa orégano”
- Agua destilada
- Balanza
- Estufa
- Balón de fondo plano
- Equipo Clevenger

##### **b. Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo**

- |                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| - Medio de cultivo: Agar BHI | - Matraz de Erlenmeyer |
| - Agua destilada             | - Varillas de vidrio.  |
| - Placas petri               | - Cocina eléctrica     |
| - Pipetas                    | - Mecheros             |
| - Tubos de ensayo            | - Autoclave            |
| - Balanza                    | - Incubadora           |
| - Probetas                   | - Refrigeradora        |

##### **c. Materiales para la prueba de sensibilidad antimicrobiana**

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| - Agar BHI.                         | - Agua destilada.                         |
| - Discos estériles de papel filtro. | - Aceite esencial de <i>Lippia alba</i> . |

- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Cepa de *Streptococcus mutans* activada
- Agua destilada
- Hisopos estériles
- Asa de siembra
- Pinzas estériles
- Placas petri
- Mecheros
- Guantes estériles

**d. Materiales para determinar resultados.**

- Cámara digital
- Regla milimetrada
- Lapicero, lápiz
- Ficha de recolección de datos.

**4.1.2. Identificación taxonómica y certificación**

Antes de trabajar con *Lippia alba* se realizó una identificación taxonómica en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo “Herbarium Truxillense (HUT)”, la planta pasó el análisis correspondiente y fue certificada.

**4.1.3. Obtención del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano)**

El aceite esencial fue obtenido por la estrategia del arrastre del vapor de agua. El beneficio de esta técnica es que se puede utilizar grandes volúmenes de material crudo, y, además, su sencillez, esfuerzo mínimo y eficiente.

La técnica depende de la forma en que los aceites esenciales son arrastrados por la inundación de vapor de agua que se produce en la fuente de vapor, en ese punto esta



mezcla (vapor de agua y aceite) se consolida pasando por un refrigerante de vidrio, el aceite y el agua quedan separados por la densidad.

Se recolectaron hojas frescas de *Lippia alba* en la ciudad de Nuevo Chimbote – Chimbote Provincia Del Santa del departamento de Ancash (22 m.s.n.m), las hojas fueron lavadas rápidamente con agua destilada para eliminar restos de arena y polvo y se conservaron hasta el día siguiente. Se recolecto aproximadamente 4 kg de materia prima. Al día siguiente las hojas se secaron en estufa a 40°C por un promedio de 20 horas. 600 gramos del material seco fue troceado con una tijera previamente esterilizada hasta un tamaño no mayor a 2mm.

Se procedió a realizar la hidrodestilación en un equipo Clevenger a partir de 600 gramos del material troceado por un tiempo promedio de 4 horas. Se obtuvo 7 ml de aceite esencial, posteriormente se secó con sulfato de sodio anhidro y fue guardado hasta su utilización en una refrigeradora.

#### **4.1.4. Disolución del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano).**

Una vez que se obtuvo el aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano), se realizó una disolución a 3 concentraciones 25 %, 50%, y 75%, usando como solvente Dimetilsulfoxido (DMSO).

#### **La disolución se realizó de la siguiente manera:**

Se utilizó como diluyente Dimetilsulfoxido al 25%

- **Concentración al 100%**, 2ml de aceite esencial de *Lippia alba* puro.

- **Concentración al 75%**, 1.5ml de aceite esencial puro, más 0.5 ml de dimetilsulfoxido 25%.
- **Concentración al 50%**, 1ml de aceite esencial puro, mas 1ml de dimetilsulfoxido 25%.
- **Concentración al 25%**, 0,5ml de aceite esencial puro, más 1.5ml de dimetilsulfoxido 25%.

#### **4.1.5. Inhibición de la cepa bacteriana**

Se utilizaron cepas estándar de *Streptococcus mutans* ATCC (American Type Culture Collection). *Streptococcus mutans* ATCC®25175, se reactivó la cepa patrón y se hizo crecer en agar BHI (BRAIN HEART INFUSION AGAR)

#### **4.1.6. Reactivación de la cepa bacteriana *streptococcus mutans atcc®25175***

Para potenciar la cepa bacteriana *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>, bajo condiciones estériles se sembró el contenido del vial en medio de Agar B.H.I y se llevó a incubar a 37 °C por 48 horas.

Después de 48 horas se extrajo un inculo en una placa con Agar B.H.I, y se llevó a incubar por 24 horas más.<sup>2</sup>

#### **4.1.7. Estandarización de la cepa patrón *Streptococcus mutans*.**

La estandarización de la cepa ATCC®25175 fue según la escala de Mc Farland 0.5, para lo cual se utilizó un inculo de colonias de *Streptococcus mutans* en 5ml de suero fisiológico hasta obtener la misma turbidez que el patrón de Mc Farland 0.5, el cual indica que existe  $1.5 \times 10^8$  bacterias por mililitro <sup>34</sup>.

#### **4.1.8. Prueba de inhibición del crecimiento bacteriano del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) frente a la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25173™.**

Bajo condiciones de esterilización se procedió a realizar la siembra usando un hisopo, se tomó un inóculo bacteriano, y se sembró en 9 placas petri que contenían agar B.H.I.

Con pinzas previamente esterilizadas se procedió a colocar en cada placa 4 discos de papel filtro con 10 ul del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano), en las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%

En nueve placas se procedió a colocar 1 disco con 10 ul de clorhexidina 0.12% el cual se usó como control positivo y 1 disco con DMSO al 25%.

Las placas fueron llevadas a anaerobiosis usando el método de la vela y fueron puestos a incubar a 37 °C por un periodo de 48 horas.

Después de las 48 horas transcurridas se procedió a la lectura de las medidas de los halos de inhibición, con la ayuda de una regla milimetrada.

#### **4.1.9. Evaluación del efecto antibacteriano**

La medición de los halos de inhibición se realizó de manera cuantitativa por medición numérica de los halos, y cualitativa bajo las pautas de Duraffourd.<sup>2</sup>

Para evidenciar la sensibilidad que tienen los diversos microorganismos a diferentes aceites esenciales Duraffourd, realizo “estudios estadísticos determinando tablas de actividad antimicrobiana basada en porcentajes”<sup>2</sup>.

Estos consideran la acción de los aceites esenciales en función al diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano (HICB).<sup>2</sup>

- Nula (-), para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible =++) para un diámetro entre 14 y 20 mm. Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++).

#### **4.1.10. Prueba de acción antibacteriana.**

El aceite esencial de *Lippia alba* a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) fue aplicado en la cepa ATCC®25175 de *Streptococcus mutans*, la cual fue adquirida del laboratorio Genlab, el cual fue reactivamente exitosa en Agar BHI, luego fue sometida a tinción Gram para observar *Streptococcus mutans*, la cual dio como resultado coloración Gram (+).

## **4.2. POBLACIÓN Y MUESTRA**

### **POBLACIÓN**

Población a trabajar cepa estándar de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™.

### **MUESTRA**

Aceite esencial de *Lippia alba* “pampa orégano”

## **4.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

### **Variables de control:**

**Control positivo** Clorhexidina 0.12%

**Control negativo** Dimetilsulfoxido (DMSO 25%)

| <b>Variable Independiente</b>   | <b>Definición</b>  | <b>Indicadores</b>   | <b>Escala</b> | <b>Categorías</b> |
|---|--|--|---------------|-------------------|
| Concentración del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “pampa orégano” | Porcentaje del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “pampa orégano” | Porcentajes de disolución del aceite esencial <i>Lippia alba</i> “pampa orégano” | Nominal       | 25%               |
|   |  |  |               | 50%               |
|   |  |  |               | 75%               |
|   |  |  |               | 100%              |

| <b>Variable dependiente</b>  | <b>Definición</b>   | <b>Indicadores</b>  | <b>Escala</b> | <b>Categorías</b> |
|--|---|---|---------------|-------------------|
| Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175™ | Es la inhibición en el crecimiento de las bacterias debido a la presencia del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “pampa orégano” | Tamaño del halo de inhibición formado alrededor del disco embebido con el aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “pampa orégano” | Razón         | 0 – 25 mm         |

#### **4.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Los datos obtenidos fueron recolectados en una ficha de forma manual y visual, para la medición de los halos de inhibición se usó una regla milimetrada, después se procedió al cálculo en Microsoft Excel.

#### **4.5. PLAN DE ANÁLISIS.**

Los datos recolectados se presentarán en gráficos y tablas de frecuencia, se utilizó hoja de cálculo Microsoft office Excel para comparar los resultados de la inhibición del crecimiento de la cepa a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lippia alba* y contrastar estas medidas, en momentos diferentes, en el grupo control y experimentación.

#### **4.6. MATRIZ DE CONSISTENCIA.**

| Título de la investigación  | Pregunta de investigación  | Objetivos   | Hipótesis   | Variables   | Tipo de investigación                    | Metodología   |
|---|--|---|---|---|--|---|
| <p>Actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa patrón de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM por acción de aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (Pampa orégano).</p> | <p>¿Cuál es la actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa patrón de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM frente al aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “pampa orégano” a diferentes concentraciones?</p> | <p><b>Objetivo general.</b><br/>Determinar la actividad inhibitoria del crecimiento de cepa patrón de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM frente al aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “pampa orégano” a diferentes concentraciones.</p> <p><b>Objetivos específicos.</b><br/>Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> a las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100%.<br/>Determinar el halo de inhibición de crecimiento bacteriano <i>in vitro</i> de la cepa patrón <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM en los discos embebidos a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (pampa orégano).</p> | <p>El aceite esencial de <i>Lippia alba</i> (pampa orégano) tiene efecto antibacteriano no sobre cepa patrón de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM.</p> | <p><b>Independiente:</b><br/>Concentración del aceite esencial de <i>Lippia alba</i> “pampa orégano”</p> <p><b>Dependiente:</b><br/>Inhibición del crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175TM</p> | <p>Explicativa de nivel cuantitativa</p> | <p>Población a trabajar cepa estándar de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC®25175<sup>TM</sup>.</p> |

#### **4.7. PRINCIPIOS ÉTICOS.**

Se promoverá la recuperación del conocimiento tradicional sobre el uso del aceite esencial de *Lippia alba*, no solo para preservar su legado cultural, sino también para registrar información relevante y demostrar científicamente sus efectos terapéuticos que servirán como nuevas fuentes de medicamentos y otros beneficios para la humanidad. La finalidad es contribuir con la protección de la biodiversidad, puesto que es un bien común.



## V. RESULTADOS

### 5.1. RESULTADOS

**Tabla 1** Actividad inhibitoria del crecimiento sobre la cepa “*Streptococcus mutans* ATCC®25175™”, por efecto del aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) a diferentes concentraciones

| Placas | Aceite<br>25% | Aceite<br>50% | Aceite<br>75% | Aceite<br>100% | Clorhexidina<br>0.12% | DMSO<br>25% |
|--------|---------------|---------------|---------------|----------------|-----------------------|-------------|
| 1      | 7 mm          | 9 mm          | 26 mm         | 20 mm          | 15 mm                 | 5 mm        |
| 2      | 23 mm         | 16 mm         | 9 mm          | 26 mm          | 14 mm                 | 5 mm        |
| 3      | 6 mm          | 11 mm         | 9 mm          | 32 mm          | 15 mm                 | 5 mm        |
| 4      | 12 mm         | 25 mm         | 8 mm          | 14 mm          | 15 mm                 | 5 mm        |
| 5      | 21 mm         | 36 mm         | 62 mm         | 62 mm          | 13 mm                 | 5 mm        |
| 6      | 30 mm         | 20 mm         | 30 mm         | 38 mm          | 10 mm                 | 5 mm        |
| 7      | 22 mm         | 26 mm         | 12 mm         | 20 mm          | 16 mm                 | 5 mm        |
| 8      | 10 mm         | 20 mm         | 38 mm         | 44 mm          | 15 mm                 | 5 mm        |
| 9      | 8 mm          | 10 mm         | 26 mm         | 34 mm          | 14 mm                 | 5 mm        |

Fuente: Ficha de recolección de datos post inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™

**Tabla 2** Tamaño de “halos de inhibición en cepas de *Streptococcus mutans* después de aplicar aceite esencial” de *Lippia alba* al 25%, 50%, 75% y 100%

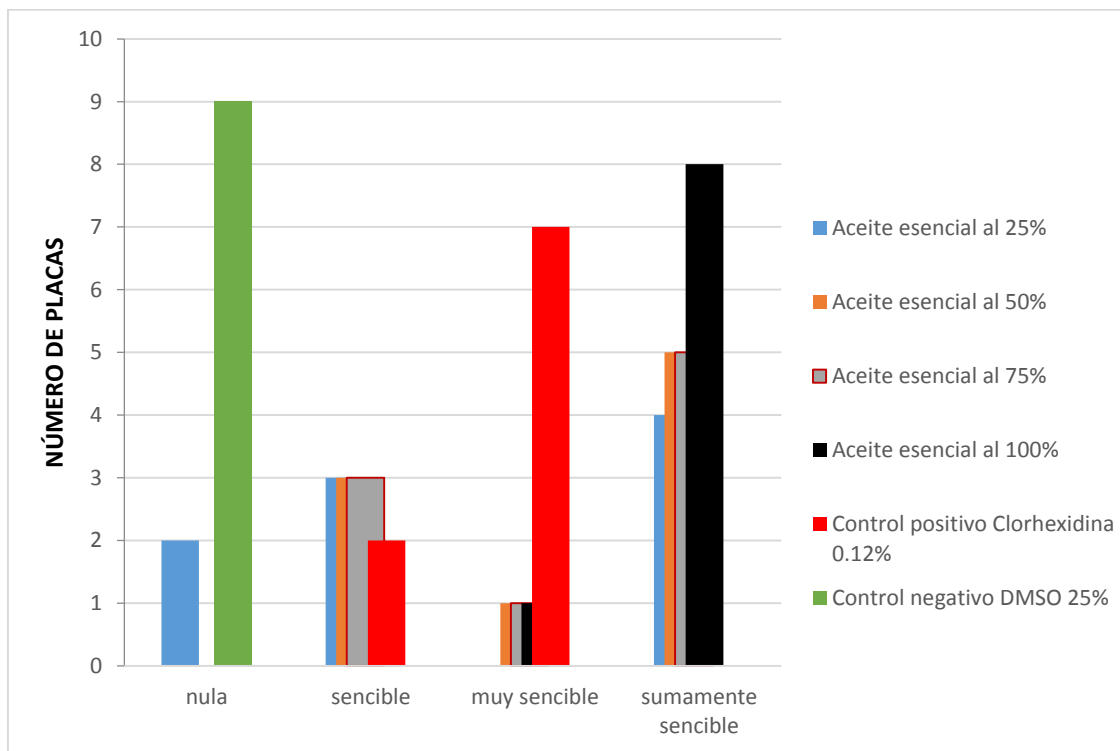
| % de aceite<br>esencial |          |          |         |         | Clorhexidina | DMSO |
|-------------------------|----------|----------|---------|---------|--------------|------|
|                         | 25%      | 50%      | 75%     | 100%    | 0.12%        | 25%  |
| <b>Promedio</b>         | 15.4 mm  | 19.2 mm  | 24.4 mm | 32.2 mm | 14.1 mm      | 5 mm |
| <b>Mediana</b>          | 12 mm    | 20 mm    | 26 mm   | 32 mm   | 15 mm        | 5 mm |
| <b>Varianza</b>         | 75.03 mm | 78.69 mm | 316.53  | 216.44  | 3.11 mm      | 0 mm |
| <b>Desv. tip.</b>       | 8.7 mm   | 8.9 mm   | 17.8    | 14.7 mm | 1.8 mm       | 0 mm |
| <b>Valor mínimo</b>     | 6 mm     | 9 mm     | 8 mm    | 14 mm   | 10 mm        | 5 mm |
| <b>Valor máximo</b>     | 30 mm    | 36 mm    | 62 mm   | 62 mm   | 16 mm        | 5 mm |

**Fuente:** Ficha de recolección de datos post inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™

**Tabla 3** “Efecto antibacteriano del aceite esencial” de *Lippia alba* 25%, 50%, 75% y 100% en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC®25175 “según escala de Duraffourd”

|                                     | <b>Aceite<br/>esencial de<br/><i>Lippia alba</i><br/>al 25%</b> | <b>Aceite<br/>esencial de<br/><i>Lippia alba</i><br/>al 50%</b> | <b>Aceite<br/>esencial de<br/><i>Lippia alba</i><br/>al 75%</b> | <b>Aceite<br/>esencial de<br/><i>Lippia alba</i><br/>al 100%</b> | <b>CONTROL<br/>POSITIVO<br/>CLORHE<br/>XIDINA<br/>0.12%</b> | <b>CONTROL<br/>NEGATIVO<br/>DMSO 25%</b> |
|-------------------------------------|---|---|---|--|---|--|
| <b>Nula (-)</b>                     | 2(22 %)   | 0(0%)   | 0(0%)   | 0(0%)  | 0(0%)   | 9(100%)                                  |
| <b>sensible (+)</b>                 | 3(33%)  | 3(33%)  | 3(33%)  | 0(0%)  | 2(22%)  | 0(0%)                                    |
| <b>muy sensible<br/>(++)</b>        | 0(0%)   | 1(11.1%)  | 1(11.1%)  | 1(11.1%)   | 7(78%)  | 0(0%)                                    |
| <b>sumamente<br/>sensible (+++)</b> | 4(44.4%)  | 5(55.5%)  | 5(55.5%)  | 8(88.8%)   | 0(0%)   | 0(0%)                                    |
| <b>Total, de placas</b>             | 9   | 9   | 9   | 9  | 9   | 9  |

Fuente: Ficha de recolección de datos post inhibición del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>



**Gráfico 1** “Efecto antibacteriano del aceite esencial” de *Lippia alba* 25%, 50%, 75% y 100% en cepas de *Streptococcus mutan* ATTCC®25175<sup>TM</sup> “según escala de Duraffourd”

## 5.2. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se obtuvo aproximadamente 9 ml de aceite esencial a partir de 600 gr de hojas secas de *Lippia alba* (pampa orégano), “mediante la técnica de arrastre de vapor de agua”. El rendimiento del aceite esencial fue de 1.5% v/p. este resultado es similar a los resultados de la investigación de Jorge A. et al<sup>6</sup>, en 1996, en la que obtuvo 2,2% v/p de rendimiento de aceite esencial.

En la investigación realizada se recolecto *Lippia alba* “pampa orégano” del distrito de Nv. Chimbote – Chimbote, provincia Del Santa – Ancash, se tomó en cuenta estudios de Pino y colaboradores<sup>6</sup> por poseer mejores propiedades fisicoquímicas, lo que nos indicaría un mayor contenido de aceite esencial y mejores condiciones para nuestro estudio.

El aceite esencial de *Lippia alba* que se obtuvo fue una sustancia oleosa de color verde transparente, el cual fue producto de la extracción de las hojas secas de la planta, en el equipo Clevenger mediante el método de arrastre de vapor de agua. No existen estudios que contribuyan con efectividad antibacteriana de *Lippia alba* contra *Streptococcus mutans*, pero si presenta actividad bactericida contra otras cepas.

Para realizar nuestros resultados cualitativamente “se tomaron en cuenta las pautas de Duraffoud que se basaron en un trabajo de Lapraz que en 1979 realizó estudios estadísticos que le permitieron establecer tablas de actividad antimicrobiana de aceites esenciales frente a un gran número de microorganismos determinando el porcentaje de acción de aceites esenciales de diversas plantas”.<sup>2</sup>

En la tabla 1 se puede observar que el aceite esencial de *Lippia alba* a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% y el control positivo de Clorhexidina al 0.12% presenta actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ y el control negativo DMSO no presenta actividad inhibitoria del crecimiento (los 5mm es el diámetro del disco). Mis resultados son similares a los de Cosco, el cual inhibió el crecimiento de *Streptococcus mutans* y la flora mixta salival por efecto de aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” el cual tuvo como resultados positivos a concentraciones de aceite 25%, 50% y 100% y el control positivo clorhexidina 0.12% tuvo mayor efectividad que el aceite al 100%.<sup>8</sup> De igual forma mi investigación coincide con la de Guerrero, que determino el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *streptococcus mutans*, donde obtuvo resultados positivos con el aceite esencial a concentraciones de 25%, 50% y 100%, el control positivo amoxicilina fue superior al aceite esencial al 100% y el control negativo dimetilsulfoxido al 25% no tuvo efecto antibacteriano.<sup>2</sup> Esto indica que el aceite esencial de *Lippia alba* “Pampa orégano” tiene superior efecto inhibitorio en el crecimiento de la cepa *Streptococcus mutans*, por otro lado al igual que la investigación de Gerrero,<sup>2</sup> el DMSO no inhibe el crecimiento de la cepa, por tal cual, se estaría confirmando que no es el diluyente quien ejerce actividad inhibitoria de nuestra cepa de bacteria estudiada.

En la tabla 2 se observan los promedios obtenidos de las sustancias aplicadas en la cepa patrón de *Streptococcus mutans* el promedio del control positivo (Clorhexidina 0.12%) fue menor 14.1 mm, que el aceite esencial de *Lippia alba* al 100%, el cual se obtuvo un

halo de inhibición de 32.2 mm, el aceite esencial de *Lippia alba* al 75% tubo un halo de inhibición de 24,4mm, al 50% se obtuvo un halo de inhibición de 19.2 mm, al 25% se obtuvo un halo de inhibición de 15.4 mm y el control negativo de DMSO 25% (dimetilsulfóxido) no obtuvo halo de inhibición del crecimiento bacteriano, lo que se consideró que los 5mm es el tamaño del diámetro del disco. Coincide con la investigación de Cosco<sup>8</sup>, en donde obtuvo promedios de halos de inhibición con aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla”, sobre cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>, concentración al 25% 10.2mm, concentración al 50% 17.8mm, concentración al 100% 22mm y control positivo clorhexidina 0.12% 24.2mm. También coincide con los resultados de Guerrero<sup>2</sup>, donde obtuvo promedios de halos de inhibición con aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre sobre cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>, concentración al 100% media de 10.79 mm, concentración al 50% media de 7.6 mm, concentración al 25% media de 5.0 mm, control positivo amoxicilina 49.3 mm y control negativo DMSO 5.0 mm. Estos resultados obtenidos indican que el aceite esencial de *Lippia alba* tiene mayor efecto inhibitorio del crecimiento de *Streptococcus mutans*, el cual para mi investigación es relativamente bueno.

En la tabla 3 se organizó los resultados según la escala de Duranffourd, en la que se obtuvo para el aceite esencial de *Lippia alba* al 100% un 0% con acción nula, un 0% con acción sensible, un 11.1% con acción muy sensible y un 88.8% con acción sumamente sensible sobre la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>, el aceite esencial al 75% se obtuvo un 0% con acción nula, 33% con acción sensible, 11.1% con acción muy sensible y un 55.5% con acción sumamente sensible sobre la cepa patrón de

*Streptococcus mutans*, el aceite esencial al 50% se obtuvo un 0% con acción nula, 33% con acción sensible, 11.1% con acción muy sensible y un 55.5% con acción sumamente sensible sobre la cepa patrón de *Streptococcus mutans*, el aceite esencial al 25% se obtuvo un 22% con acción nula, un 33% con acción sensible, 0% con acción muy sensible y un 44.4 % con acción sumamente sensible, el control positivo (Clorhexidina 0.12%) se obtuvo un 0 % con acción nula, un 22% con acción sensible, un 78% con acción muy sensible y un 0% con acción sumamente sensible, a diferencia del control negativo DMSO que se obtuvo un 100% de acción nula. Según la escala de Duranfourd indican que mis resultados son relativamente buenos y con la mínima concentración que se trabajó “aceite esencial al 25%” tiene alto porcentaje de acción sumamente sensible el cual es relativamente bueno.

En esta investigación se buscó determinar si el aceite esencial de *Lippia alba* “pampa orégano” ejercía efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa patrón *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>, con estos resultados, se observa y se demuestra la existencia de un efecto de inhibición del desarrollo bacteriano con el aceite estudiado, según los resultados obtenidos; además se encontró diferencias significativas con respecto al tamaño del halo de inhibición a distintas concentraciones de aceite esencial de *Lippia alba*.

Los resultados de esta investigación son de mucha importancia ya que contribuyen a validar el potencial del aceite esencial de *Lippia alba* como un antibacteriano y que podría ayudar a la formulación de productos medicinales en el manejo de la salud bucal, y otros.



## VI. CONCLUSIONES.

- El aceite esencial de *Lippia alba* (pampa orégano) al 100%, presentó mayor efecto inhibitorio del crecimiento de la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup> con un halo promedio de 32.2 mm, comparado con las concentraciones al 75 %, 50% y 25%.
- Según la escala de Duranffourd, el aceite esencial de *Lippia alba* al 100% presento actividad sumamente sensible (+++) sobre la cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>.
- El control positivo (Clorhexidina 0.12%) presento menor tamaño de halo de inhibición promedio de 14.1 mm, comparado con el aceite esencial de *Lippia alba* al 25% cuyo promedio fue de 15.4 mm, lo que indica comparado con este control presento mayor efecto inhibitorio del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC®25175<sup>TM</sup>.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Mercedes K. Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanolico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN ESTOMATOLOGÍA. Trujillo, Perú 2015. Disponible en: [http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/972/1/CENTURI%C3%93N\\_K\\_ARINA\\_ANTIBACTERIANO\\_INVITRO\\_ETAN%C3%93LICO.pdf](http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/972/1/CENTURI%C3%93N_K_ARINA_ANTIBACTERIANO_INVITRO_ETAN%C3%93LICO.pdf)
2. Guerrero H, Medalith G. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) EN *Streptococcus mutans*. Tesis para optar el Título Profesional de CIRUJANO DENTISTA. Lima – Perú 2014. Disponible en: [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3680/1/Huari\\_gg.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3680/1/Huari_gg.pdf)
3. Castro V. INHIBICION DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE STREPTOCOCCUS MUTANS POR PAPAINA Y SANITREND. TRABAJO DE INVESTIGACION REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE CIRUJANO-DENTISTA. Santiago – Chile 2005. Disponible en: [http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/castro\\_v/sources/castro\\_v.pdf](http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/castro_v/sources/castro_v.pdf)
4. Chero D. EFECTO ANTIBACTERIANO In Vitro DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE *Psidium guajava* y *Medicao sativa* SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175. TESIS PARA OBTAR EL TITULO PROFESIONAL DE

- CIRUJANO DENTISTA. Pimentel – Perú 2016. Disponible en: <http://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/uss/145/1/tesis%201.pdf>
5. Gomes L. Gomes G. Duran D, Stashenko E, Betancur L. Composición química y evaluación de la actividad anti herpética in vitro de aceites esenciales de *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown y sus componentes mayoristas. Artículo en Salud UIS – diciembre 2010. Salud UIS 2010; 42: 230-239. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/German\\_Gomez-Rios/publication/262428134\\_Chemical\\_Composition\\_and\\_evaluation\\_in\\_vitro\\_of\\_anti-herpetic\\_activity\\_of\\_essential\\_oils\\_from\\_Lippia\\_alba\\_Mill\\_NE\\_Brown\\_and\\_the\\_main\\_components/links/53e68bb30cf21cc29fd70496/Chemical-Composition-and-evaluation-in-vitro-of-anti-herpetic-activity-of-essential-oils-from-Lippia-alba-Mill-NE-Brown-and-the-main-components.pdf](https://www.researchgate.net/profile/German_Gomez-Rios/publication/262428134_Chemical_Composition_and_evaluation_in_vitro_of_anti-herpetic_activity_of_essential_oils_from_Lippia_alba_Mill_NE_Brown_and_the_main_components/links/53e68bb30cf21cc29fd70496/Chemical-Composition-and-evaluation-in-vitro-of-anti-herpetic-activity-of-essential-oils-from-Lippia-alba-Mill-NE-Brown-and-the-main-components.pdf)
  6. Jorge A. Pino A. Ortega L. Rosado A. Rodrigues, Baluja R. Composición y propiedades antibacterinas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E Brown. Rev Cubana Farm V.30(1). Ciudad de Habana ene.-abr. 1996. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75151996000100007&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75151996000100007&script=sci_arttext&tlng=pt)
  7. Sandra C, Henao R, Martinez J, Pacheco N, Marín J. Actividad bactericida de extractos acuosos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown contra *Helicobacter pylori*. Rev Col Gastroenterol vol.26 no.2 Bogotá Apr./June 2011. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-99572011000200002](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572011000200002)

8. Glauce S., Tiago G., Vale V., Rao F., Matos. “Analgesic and Antiinflammatory Effects of Two Chemotypes of *Lippia alba*: a Comparative Study”. 1998, *Pharm. Biol.*, 36, 5, 347-351.
9. Vale T., Matos F., De Lima T., Viana G., “Behavioral effects of essential oils from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown chemotypes”, *J. Ethnopharmacol.*, 1999. 1, 167, 127-133.
10. Hatano V., Torricelli A., Giassi A., Coslope L., Viana M. “Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze”. 2012. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 45, 3, 238-243.
11. Puertas M., Hillebrand S., Stashenko E., Winterhalter P. “In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.)”. 2002. *Flavour Fragr. J.*, 17, 380-384.
12. Parodi T., Cunha M., Heldwein C., de Souza D., Martins Á., Garcia L., Wasielesky W., Monserrat J., Schmidt D., Caron B., Heinzmann B., Baldisserotto B. “The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae)”. 2012. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 155, 3, 462-468.
13. Zétola M., De Lima T., Sonaglio D., González G., Limberger, R., Petrovick, P., Bassani V. “CNS activities of liquid and spray-dried extracts from *Lippia alba*, Verbenaceae (Brazilian false melissa)”. 2002. *J. Ethnopharmacol.*, 82, 207-215.

14. Guerrero M., Puebla P., Carrón R., Martín M., Arteaga L., San Román L.  
“Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanolic extracts of some Colombian medicinal plants”. 2002. *J. Ethnopharmacol.*, 80, 37-42.
15. Filho J., Melo J., Saraiva A., Gonçalves A., Psiottano M., Xavier H.  
“Antimicrobial activity and phytochemical profile from the roots of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown”. 2006. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16, 4, 506-509.
16. Ara N., Nur M., Amran M., Wahid M., Ahmed M. “In vitro antimicrobial and cytotoxic activities of leaves and flowers extracts from *Lippia alba*”. 2009 *Pak. J. Biol. Sci.* 12, 1, 87-90.
17. Cosco D. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y la flora mixta salival por acción del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* manzanilla. Tesis para optar el título de cirujano dentista. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Odontología. Lima, Perú 2010. Disponible en: <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/DANYALEJANDROCOSCOROBLES.pdf>
18. Duran D., Monsalve L., Rene J., Stashenko. Estudio comparativo de la composición química de aceites esenciales de *Lippia alba* provenientes de diferentes regiones de Colombia, y efecto del tiempo de destilación sobre la composición del aceite. Vol 1 (33) 2007. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6067/3305>
19. Riguelet, J., Ocampo R., Henning C., Padín S., Urrutia M., Dalbello G.  
Actividad insecticida del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown sobre *Tribolium castaneum* Herbst. en granos de trigo (*Tricum aestivum* L.). *Revista*

Brasileira de Agroecología. Rev. Bras. de Agroecologia. 9(2): 214-222 (2014).

Disponible en:

[http://orgprints.org/27407/1/Ringuelet\\_Actividad%20insecticida%20del%20aceite%20esencial%20de.pdf](http://orgprints.org/27407/1/Ringuelet_Actividad%20insecticida%20del%20aceite%20esencial%20de.pdf)

20. Peso N. Gonzales A. Caracterización Agronómica de Pampa orégano. Folia Amazónica. Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana. VOI. 9 (1-2) – 1998. Disponible en:

<http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/Folia%209.pdf#page=179>.

21. Reyes G. Efecto de la infusión de *Lippia alba* en los parámetros productivos y control bacteriano en pollos de engorde. Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias Carrera De Medicina Veterinaria y Zootecnia. Unidad Técnica de Machala. Machala 2017. Disponible en:

[http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10537/1/DE00005\\_TRABAJO\\_DETITULACION.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/10537/1/DE00005_TRABAJO_DETITULACION.pdf)

22. Morataya M. Caracterización Farmacopeica de cuatro plantas aromáticas de Guatemala Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), Oregano (*Lippia graveolens*), Salvia sija (*Lippia alba*) y Salvuyá (*Lippia chiapasensis*). Tesis para optar el título de Química Farmacéutica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala 2016. Disponible en:

[http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2389.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2389.pdf)

23. Linde G. Colauto N. Alberto E. Gazim Z. Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. Revista Scielo.

Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, p.191-200, 2016. Disponible en:

<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v18n1/1516-0572-rbpm-18-1-0191.pdf>

- 24.** Peña N. FITOQUÍMICA Y FARMACOLOGÍA DE *Lippia schlimii* (VERBENACEAE). Tesis doctoral presentada como requisito para optar el Título de Doctor en Química. Universidad de Zulia. Maracaibo 2013. [en Línea]. Disponible en: [http://tesis.luz.edu.ve/tde\\_arquivos/2/TDE-2013-10-17T14:49:13Z-4162/Publico/pena\\_andrade\\_nestor\\_segundo.pdf](http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/2/TDE-2013-10-17T14:49:13Z-4162/Publico/pena_andrade_nestor_segundo.pdf)
- 25.** Zoghbi M., Andrade E., Santos A., Silva M., Maia J. “Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br Growing Wild in the Brazilian Amazon”. 1998. Flavour Fragr. J., 13, 47-48.
- 26.** Barrera R. Alarcón E. Gonzalez L. Villa A. Montes C. Síntesis de carveol, carvona, verbenol y verbenona. Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Ingeniería y Competitividad, Volumen 10, No. 1, p. 43 - 63 (2008). Disponible en: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/bitstream/10893/1663/1/vol.10%20no.1%20art.4.pdf>
- 27.** Blanco M. Rendimiento de biomasa y aceite esencial de quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown en respuesta a las prácticas agronómicas, y sus propiedades farmacológicas. Trabajo de tesis de maestría en plantas medicinales. Universidad Nacional de la Plata. Departamento de Ciencias Biológicas. 2014. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/43581/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/43581/Documento_completo.pdf?sequence=1)

28. Huchelman A. Gastaldo C. Veinante M. Zeng Y. Heintz D. Tritsh D. Schaller H. Rohmer M. Bach T. Hemmerlin A. S-Carvone Suppresses Cellulase-Induced Capsidiol Production in *Nicotiana Tabacum* By Interfering with Protein Isoprenylation. *Plant Physiology*. 2014 Feb; 164(2): 935–950. Disponible en: <https://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&tl=es&u=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fpmc%2F&anno=2>
29. Ocampo R., Ríos L., Betancur L., Ocampo D. Curso práctico de Química Orgánica Enfocado a la Biología y los Alimentos. Editorial Universidad de Caldas. 2008. Disponible en: [https://books.google.com.pe/books?id=qmFQ3LwymmMC&pg=PA39&dq=fenilpropanoides&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=fenilpropanoides&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=qmFQ3LwymmMC&pg=PA39&dq=fenilpropanoides&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=fenilpropanoides&f=false)
30. Dellascassa E. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Porto Alegre, 2010. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=KkoCitWOKwkC&oi=fnd&pg=PA97&dq=taxonomia+de+lippia+alba+articulos&ots=KVJSDD-sG5&sig=MF0jboTkEC40f-cVB0oThWXcGmw#v=onepage&q&f=false>
31. Stashenko E. Aceites Esenciales. Primera edición. CENIVAM. Departamento administrativo de Ciencias, Tecnología e innovación. Universidad Industrial de Santander. Colombia, Octubre 2009. Disponible en: <http://cenivam.uis.edu.co/cenivam/documentos/libros/1.pdf>
32. Negroni M. Microbiología estomatológica. Edición Medica Panamericana: Buenos Aires 1999: 200 -2017.



**33.** Liebana J. Microbiología oral. Primera edición. España 1995: 227 – 31, 447 – 461.

**34.** Becton, Dickinson and Company. Patrón de Turbidez BBL preparado, McFarland Turbidity Standard N° 0.5. BD. 8808421JAA 20005/02. [EN LÍNEA]. Disponible en:

[http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)\\_es.pdf](http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)

## ANEXOS

**Figura 1.** Certificación de *Lippia alba* por la Universidad Nacional de Trujillo “Herbarium truxillense (HUT)”



**Figura 2.** Recolección de hojas de *Lippia alba* (pampa orégano)





**Figura 3.** Deshidratación de *Lippia alba*, en estufa a 40 °C

**Figura 4.** Cortando *Lippia alba* para obtener aceite esencial en equipo Clevenger.



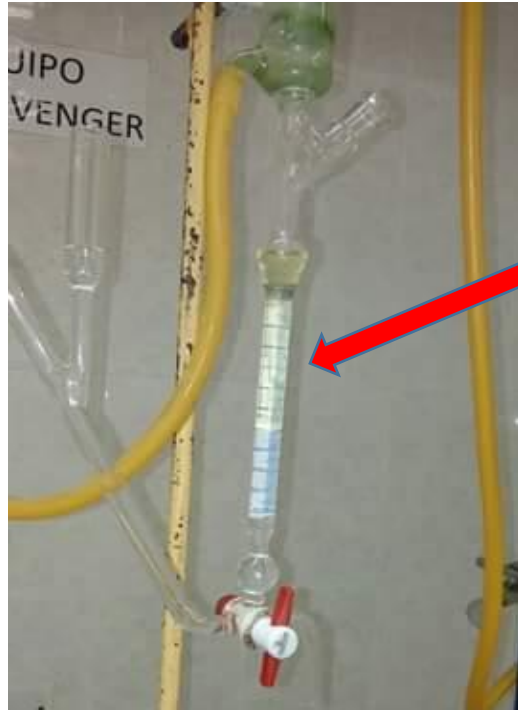


**Figura 5.** Colocando *Lippia alba* troceada en equipo Clevenger.

**Figura 6.** Obtención aceite esencial de *Lippia alba* por medio de equipo Clevenger



**Figura 7.** Aceite obtenido de *Lippia alba*



**Figura 8.** Preparación de medio de cultivo de *Streptococcus mutans*.



**Figura 9.** Esterilización de medio de cultivo para siembra de *Streptococcus mutans*.

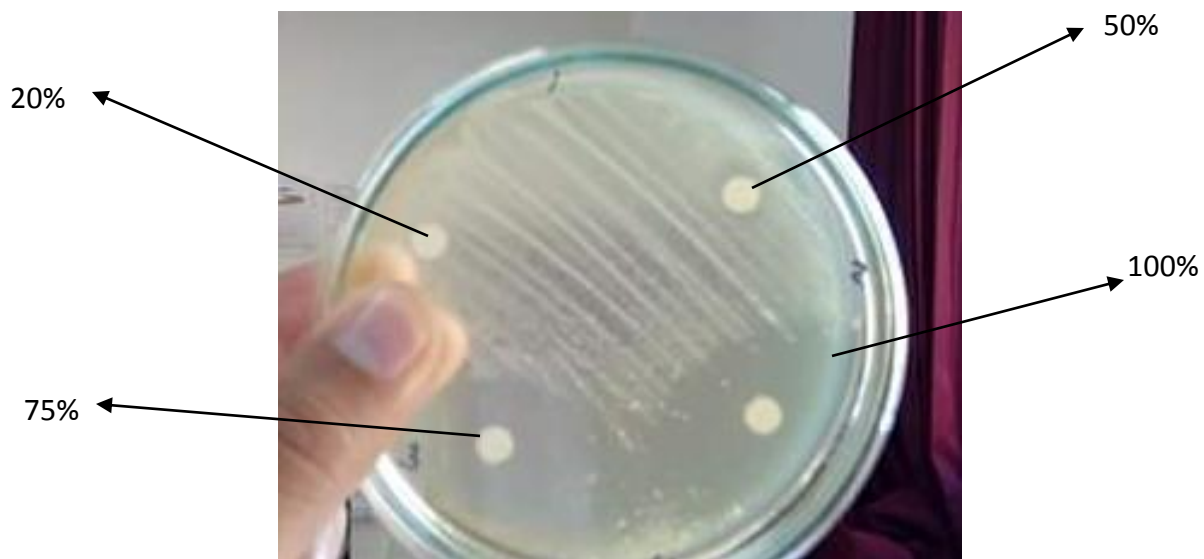


**Figura 10.** Siembra realizada, inhibiendo el crecimiento de cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175TM, por aceite esencial de *Lippia alba* a diferentes concentraciones en anaerobiosis en método de la vela.



**Figura 11.** Halos de inhibición de cepa patrón de *Streptococcus mutans*

ATCC®25175™ por aceite esencial a concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100%

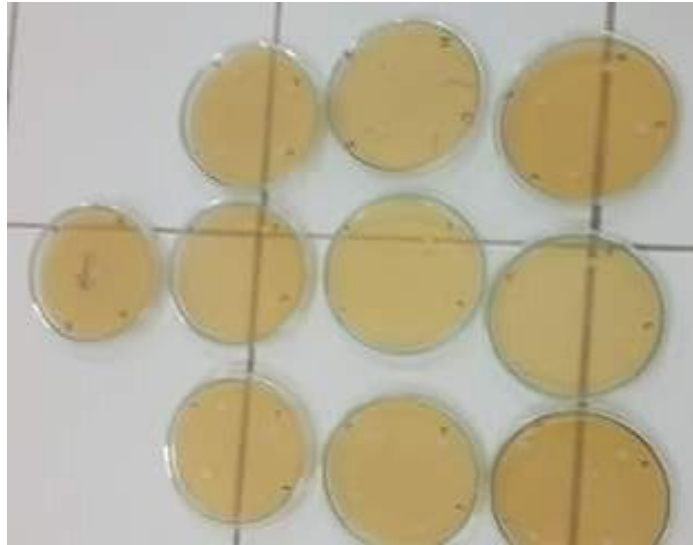


**Figura 12.** Halo de inhibición de cepa patrón de *Streptococcus mutans*

ATCC®25175™ por control positivo Clorhexidina 0.12%



**Figura 13.** Placas de inhibición del crecimiento de cepa patrón de *Streptococcus mutans* por aceite esencial de *Lippia alba*.



**Figura 14.** Realizando observación morfológica de cepa patrón de *Streptococcus mutans* ATCC®25175™, por tinción Gram.





## ANEXO 1

### TABLA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICION SOBRE LA CEPA PATRON STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC®25175™

| <i>Placas</i> | <i>Aceite 25%</i> | <i>Aceite 50%</i> | <i>Aceite 75%</i> | <i>Aceite 100%</i> | <i>Clorhexidina 0.12%</i> | <i>DMSO 25%</i> |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------------|-----------------|
| <b>1</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>2</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>3</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>4</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>5</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>6</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>7</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>8</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |
| <b>9</b>      |                   |                   |                   |                    |                           |                 |