

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EFFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE
FRUTOS DE *Schinus molle* L. (MOLLE) FRENTE A *Streptococcus
mutans* y *Candida albicans*.**

Tesis presentada por la Bachiller:
VELASQUEZ SANCHEZ,
MARIA ALEJANDRA

Para optar el Título Profesional de:
Bióloga

Asesor:
Dr. Fernández Rivera, José Alberto

AREQUIPA – PERÚ

2021

Dr. José Alberto Fernández Rivera
ASESOR

JURADO

Mg. Adolfo Román Ramos Paredes
PRESIDENTE

Mg. Carmen Rosa Chancayauri Vaca
SECRETARIO

Dr. José Alberto Fernández Rivera
INTEGRANTE

DEDICATORIA

A Dios, que ha sido siempre mi fortaleza en los momentos más difíciles de mi vida.

A Ángela mi madre, porque siempre estuvo dándome ánimos cada vez que desfallecía, por brindarme su inmenso amor, su comprensión y sus sabios consejos.

A Carlos mi padre, que día a día me demuestra todo el esfuerzo que hace por sacar nuestra familia adelante, por su cariño desmedido, su comprensión y por siempre sacarme una sonrisa.

A mi hermana Camila, pues su inocencia, su manera de ser y su cariño hacen de mí, una persona mejor y feliz.

A mi tío Pepe, el cual siempre me ofrece su apoyo y su cariño.

A mi abuelito, papá Jesús, que a pesar de la irreversibilidad del tiempo siempre mantiene ese espíritu alegre; y a mis abuelitas Laura, Fabiana y Lucy que desde la eternidad cuidan de mí, y a las cuales tengo presente cada día de mi vida.

A toda mi familia que siempre cree en mí, y a Anthony, por su amor, comprensión y aliento brindado en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A los docentes de la Escuela Profesional de Biología, ya que gracias a sus enseñanzas he podido desarrollarme en esta carrera profesional.

Al Departamento de Microbiología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín, por las facilidades de acceso al Laboratorio y utilización de equipos.

Al Dr. José Fernández Rivera, por su amistad, guía, ayuda e incommensurable paciencia en todo el tiempo invertido en el desarrollo de esta investigación, al cual admiro y respeto mucho.

A la Dr. Ruth Álvarez Monge, de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María, por su apoyo y colaboración al brindarme la facilidad de conseguir la cepa bacteriana utilizada en esta investigación.

Al Dr. Jorge Chávez Fernández, Dra. Eleana Vargas de Nieto y Dra. Virginia Lizárraga Lazo, del Departamento Académico de Química de la Universidad Nacional de San Agustín, por su apoyo y aportes brindados en el proceso de la obtención del aceite esencial de *Schinus molle* para esta investigación.

Al My. S. PNP. Juan Santos Lovatón del Área de Biología Forense de la División de Investigación Criminal (DIVINCRI), My. S. PNP. Marcela Vargas Flores y Cmdte. S. PNP. Marco Florez Ticona del Laboratorio Clínico del Hospital Cívico Policial de la PNP, por su amistad, apoyo y por permitirme el acceso a sus laboratorios para continuar con esta investigación.

Y a mis amigas, Daniela y Lucero, que me brindaron su apoyo en la iniciación de esta investigación.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUCCIÓN.....	XI
OBJETIVOS.....	XII
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	
1. ANTIMICROBIANOS NATURALES.....	1
1.1. COMPUESTOS QUÍMICOS DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA OBTENIDOS DE PLANTAS MEDICINALES.....	4
1.2. PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS MEDICINALES..	5
1.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	6
1.4. <i>Schinus molle</i> L.....	8
1.5. ACEITE ESENCIAL <i>Schinus molle</i> L.....	10
1.6. ETNOBOTÁNICA.....	11
1.7. DISTRIBUCIÓN.....	11
1.8. MICROBIOTA ORAL.....	12
1.8.1. BACTERIAS ASOCIADAS A LAS CARIES DENTALES.....	14
1.8.1.1. GÉNERO <i>Streptococcus</i>	17
A. <i>Streptococcus mutans</i>	19
CLASIFICACIÓN DE <i>Streptococcus mutans</i>	20
1.8.2. HONGOS ASOCIADOS A INFECCIONES BUCALES.....	21

1.8.2.1. GÉNERO <i>Candida</i>	21
A. <i>Candida albicans</i>	22
1.9. EVALUACIÓN DE DOSIS LETAL 50 (DL 50) DE LAS PLANTAS MEDICINALES.....	22
1.10. ANTECEDENTES.....	24
CAPÍTULO II	
MATERIAL Y MÉTODOS	
2. METODOLOGÍA.....	28
2.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	28
2.2. ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i>	28
2.2.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL.....	28
2.3. AISLAMIENTO DE LAS BACTERIAS Y HONGOS.....	29
2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> L.....	29
2.4.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN.....	30
A. DIFUSIÓN HOYO – PLACA.....	30
2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).....	31
A. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO.....	31
CAPÍTULO III	
RESULTADOS	
3.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).....	34

3.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (CMF).....	35
3.3. SENSIBILIDAD.....	35
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS.....	53

RESUMEN

Las infecciones a nivel bucal son de suma importancia debido a que los agentes presentes en ella, forman parte de la microbiota bucal natural y la pérdida de equilibrio en su entorno es lo que, posteriormente, desencadenará dichas infecciones. Esta investigación tiene como objetivo, determinar el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* (molle) frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, ambos microorganismos implicados en procesos infecciosos bucales, por lo tanto, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida/fungicida (CMB/CMF), además de evaluar la sensibilidad de cada microorganismo frente al aceite esencial del molle. Obteniendo como resultados que la CMI y la CMB para la cepa de *S. mutans* fue de 100 $\mu\text{L/ml}$ y 200 $\mu\text{L/ml}$ respectivamente; asimismo para la cepa de *C. albicans* la CMI fue de 25 $\mu\text{L/ml}$ y la CMF de 50 $\mu\text{L/ml}$; finalmente la sensibilidad de *S. mutans* fue de 20 a 100 μL y para *C. albicans* de 75 a 100 μL .

Palabras clave: Aceite esencial de *Schinus molle*, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, CMI, CMB, sensibilidad bacteriana-fúngica.

ABSTRACT

Oral infections are extremely important because the agents present in it are part of the natural oral microbiota and the loss of balance in its environment is what will subsequently trigger these infections. This research aims to determine the in vitro antimicrobial effect of the essential oil of *Schinus molle* (molle) fruits against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, both microorganisms involved in oral infectious processes, therefore, the minimum concentration was determined. inhibitory (MIC) and the minimum bactericidal/fungicidal concentration (MBC/MFC), in addition to evaluating the sensitivity of each microorganism against the essential oil of molle. Obtaining as results that the MIC and MBC for the *S. mutans* strain was 100 μ L / ml and 200 μ L / ml respectively; likewise, for the *C. albicans* strain, the MIC was 25 μ L / ml and the MFC was 50 μ L / ml; finally the sensitivity of *S. mutans* was 20 to 100 μ L and for *C. albicans* it was 75 to 100 μ L.

Key words: *Schinus molle* essential oil, *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, MIC, MBC/MFC, bacterial-fungal sensitivity.

INTRODUCCIÓN

El uso de aceites esenciales de plantas nos ofrece una alternativa natural para tratar enfermedades de todo tipo siendo a la vez un recurso económico y de confianza para la población a comparación de los productos de origen sintético (químicamente formados). Diversos estudios han demostrado las propiedades de *Schinus molle* L. tales como antimicrobianas, antiinflamatorias, antifúngicas y analgésicas (Rivadeneira D. & Álvarez P. 2015).

La cavidad bucal humana ofrece el portal perfecto de entrada a virus y bacterias del medio ambiente, por lo tanto, es uno de los hábitats más densamente poblados del cuerpo humano (Cruz S. et al. 2017).

La microbiota oral es un complejo ecosistema que contiene una amplia variedad de especies microbianas. La boca es colonizada por varios microorganismos antes de la erupción de los dientes, sin embargo, los recién nacidos son esencialmente libres de microorganismos. Con la erupción de los dientes, la placa dental se desarrolla en las superficies dentales expuestas las cuales están cubiertas por una película amorfa, casi invisible compuesta principalmente por glicoproteínas salivales. De no tomarse medidas de higiene oral, las superficies de los dientes acumulan grandes masas microbianas, mientras que la descamación de células epiteliales no permite la acumulación en las superficies de la mucosa oral. El número de bacterias en placa dental puede alcanzar 10⁸ por mg (peso húmedo) (Ojeda J. et al. 2013).

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* (Ojeda J. et al. 2013).

Muchos de los estreptococos pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. Las especies más importantes en el humano son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (Ojeda J. et al. 2013).

Por otro lado, los hongos del género *Candida* son habitantes habituales en boca, sistema gastrointestinal, piel y vagina, por lo que se consideran agentes infecciosos endógenos específicos. Son poco virulentos, no son transmisibles y solo producen infección de la mucosa en presencia de una predisposición local o general manifiesta o ambas, de ahí que sean considerados hongos oportunistas (Rodríguez J. *et al.* 2002).

Las interacciones entre hongos y bacterias pueden influir en la salud bucal como lo ejemplifica la relación sinérgica entre *Candida albicans* y estreptococos orales (Cruz S. *et al.* 2017).

La importancia de mantener en condiciones saludables la cavidad oral tiene como finalidad evitar que microorganismos presentes en infecciones de origen bucal pasen al interior del organismo y produzcan una patología a distancia (Trinchitella A. 2006).

Asimismo, la sonrisa es parte significativa de nuestra imagen personal, del mismo modo cuidar la salud de la cavidad oral es esencial; por ello la presente investigación tiene como finalidad determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de frutos de *Schinus molle* L. (molle) frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, y de esta manera contribuir con una propuesta económica para la salud oral.

OBJETIVOS

- OBJETIVO GENERAL:

Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* (molle) frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*.

- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L. (molle) frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*.
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial los frutos de *Schinus molle* L. (molle) frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*.
- Determinar la sensibilidad de *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* frente al aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L. (molle).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. ANTIMICROBIANOS NATURALES:

En el último cuarto del siglo XIX, a partir de los estudios de Pasteur y Koch, se demostró la implicación microbiana en la génesis de varias enfermedades epidémicas (Marcén J. 2000).

Los ensayos realizados hasta este momento revelan que las plantas representan una potencial fuente de nuevos agentes antimicrobianos (Zampini I. et al. 2007).

Cuando el hombre fue encontrando curas o paliativos para las enfermedades que le aquejan en hojas, raíces, cortezas, semillas, frutos o flores de plantas silvestres, además de dar inicio a lo que se conoce como herbolaria o medicina tradicional herbolaria, se empezó a establecer una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una, distinguiendo una planta de otra solo por las características externas más notorias y por su aroma, ya que aún no se establecía lo que hoy se conoce como taxonomía vegetal. (Loruhama S. et al. 2016)

Las plantas tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna como son: fuente directa de agentes terapéuticos, materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas (Loruhama S. et al. 2016).

Desde el auge de los antibióticos a finales de la década del 40 en el siglo pasado, el uso de derivados vegetales como agentes antimicrobianos ha sido escaso, a causa principalmente de la fuerte presión de la industria farmacéutica a favor de los productos sintéticos, semisintéticos o los obtenidos por fermentación de hongos, fácilmente patentables (Ramírez A. et al. 2017).

La flora peruana es muy rica en especies a la que la medicina tradicional atribuye eficaces propiedades terapéuticas (Huarino M. & Ramos D. 2013).

La mayoría de estas plantas sometidas a estudio han demostrado poseer efectos antibacterianos y antifúngicos, muy aparte de que poseen otras propiedades curativas además de las mencionadas; las cuales podrían estar relacionadas con la biosíntesis

de metabolitos biológicamente activos, según el hábitat donde crecen las plantas (Azüero A. et al. 2016).

Las plantas tienen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos, la mayoría relacionados con el fenol y sus derivados (Domingo D. & López M. 2003).

Para el estudio de las plantas medicinales, la metodología a seguir, comprende las siguientes etapas (Verde M. et al. 2016):

- Estudios Etnobotánico y Etnofarmacológico basados en investigación bibliográfica exhaustiva, para conocimiento del uso tradicional y los efectos de las plantas dotadas con propiedades medicinales.
- Estudio de Actividad Biológica: Comprobación científica del uso terapéutico por ensayos que involucran evaluación in vitro o in vivo.
- Estudio Fitoquímico: por medio de un ensayo biodirigido, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta a partir del cual puede orientarse el fraccionamiento de los extractos.
- Estudios de Toxicidad y Citotoxicidad: evaluación sobre organismos o células del posible efecto tóxico de los extractos de plantas.
- Desarrollo de un producto fitoterapéutico: Formular con los extractos o compuestos activos un fitofármaco para su evaluación clínica.

A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos ya que estos por separado poseen mucha menor actividad que cuando se encuentran juntos. Se considera que la toxicidad de los extractos es más reducida cuando se encuentran todos sus compuestos que cuando se encuentran purificados, este fenómeno se denomina buffering (Shiva C. 2007).

La medicina natural, a partir de las plantas y sus propiedades antimicrobianas, últimamente ha recibido mucha atención de los científicos, ya que presentan actividad antibacteriana capaz de combatir a agentes patógenos (Pimentel E. et al. 2015).

En cuanto a sus propiedades antimicrobianas, estas se atribuyen fundamentalmente a algunos de sus componentes, entre los que destacan: terpenos, aceites esenciales, cumarinas y flavonoides (Shiva C. 2007); que pueden encontrarse distribuidas por toda la planta o en alguna de sus partes (Huarino M. & Ramos D. 2013).

Los aceites esenciales poseen propiedades medicinales muy diversas tales como: sedantes, antiespasmódicas y desinfectantes (Loruhama S. et al. 2016).

Los metabolitos primarios presentes en los vegetales son: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminos, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, los que a su vez producen metabolitos secundarios, que son sustancias que no participan de forma directa en el crecimiento o desarrollo, es decir, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno, ya sea como mecanismo de defensa contra predadores o como materia de almacenamiento (Verde M. et al. 2016).

Algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica, como por ejemplo atraer a los insectos para transferirles el polen, o a animales para que éstos consuman sus frutos y así poder diseminar sus semillas; también pueden actuar como pesticidas naturales de defensa contra herbívoros o microorganismos patógenos, incluso como agentes alelopáticos (sustancias que permiten la competencia entre especies vegetales), también se pueden sintetizar metabolitos secundarios en respuesta a daño en algún tejido de la planta, así como contra la luz UV y otros agentes físicos agresivos, incluso actuar como señales para la comunicación entre plantas con microorganismos simbiotes (Verde M. et al. 2016).

Dada que estos productos son muy bien aceptados por el consumidor, son una de las alternativas a los antibióticos promotores de crecimiento con más futuro, y la búsqueda de nuevas sustancias representa una importante área de investigación en el campo de los aditivos alimentarios (Shiva C. 2007).

Dentro de estos metabolitos secundarios se conocen actualmente más de 3000 aceites esenciales distintos, de estos, aproximadamente 300 son importantes a nivel comercial e industrial, debido a su sabor y fragancia, siendo utilizados principalmente en la industria de alimentos y la perfumería (Bermúdez M. et al. 2019).

1.1.COMPUUESTOS QUÍMICOS DE ACCIÓN ANTIMICROBIANA OBTENIDOS DE PLANTAS MEDICINALES

Los Terpenoides, Esteroles, Compuestos fenólicos, Flavonoides, Cumarinas, Quinonas, Lignanós, Glicósidos cianógenicos, Glicósidos cardiotónicos, Iridoides, Alcaloides, Saponinas. Sesquiterpenlactonas, principalmente (Loruhama S. *et al.* 2016).

Los compuestos fenólicos simples, son los compuestos fitoquímicos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol, y los ácidos cinámico y cafeico. El número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parece que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. El mecanismo parece estar desarrollado con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas (Domingo D. & López M. 2003).

Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. El potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Domingo D. & López M. 2003).

Los taninos son sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero. Constituyen un grupo de sustancias fenólicas poliméricas y se pueden dividir en hidrolizables y condensados. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias (Domingo D. & López M. 2003).

Las cumarinas son compuestos derivados de la venzo- α -pirona, como la cumarina, la esculetina, la umbeliferona y la escopoletina. Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. Parece que su mecanismo de

acción antimicrobiana es mediante interacción con el DNA eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Domingo D. & López M. 2003).

Las flavonas son estructuras fenólicas que contienen un grupo carbonilo. Constituyen la familia más amplia de fenoles naturales. Su actividad frente a los microorganismos probablemente se debe a que forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas (Domingo D. & López M. 2003).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otros, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Domingo D. & López M. 2003).

Existen otros compuestos con acción antimicrobiana, aislados de plantas, como los aldehídos, las saponinas, los sulfóxidos, los azúcares y los alcanos (Domingo D. & López M. 2003).

1.2. PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS MEDICINALES

Los aceites esenciales son sustancias volátiles, fragantes de consistencia aceitosa, típicamente producida por todos los órganos de las plantas (Bermúdez M. et al. 2019); la síntesis y acumulación de los aceites esenciales se asocia a la presencia de estructuras histológicas especializadas, a menudo localizadas sobre o en la proximidad de la superficie de la planta: células con aceites esenciales de las *Lauraceae* o de las *Zingiberaceae*, pelos secretores de las *Lamiaceae*, glándulas secretoras de las *Myrtaceae* o las *Rutaceae*, canales secretores de las *Apiaceae* o las *Asteraceae*, y pueden ser aislados de las hojas (ajenojo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), el tallo (canela, caparrapí, etc.), las flores (árnica, lavanda, manzanilla, piretro,

tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.) (Shiva C. 2007).

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se debe a la inhibición o interacción de la mezcla de compuestos con múltiples blancos en la célula. Por ejemplo, su propiedad hidrofóbica, que resulta en la ruptura de la membrana lipídica de la membrana celular, aumentando su permeabilidad, lo que ocasiona la pérdida del contenido celular vital y su posterior muerte (Bermúdez M. et al. 2019).

1.3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante diferentes métodos como: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, *enfleurage* y con fluidos supercríticos (Shiva C. 2007).

Tabla N° 1. Métodos de extracción (Shiva C. 2007).

Adaptado de San Martín, R. 1977 (125)

MÉTODO	PROCEDIMIENTO		PRODUCTOS OBTENIDOS
Métodos directos	Expresión	Compresión de cáscaras	Aceites esenciales cítricos
		Raspado de cáscaras	
	Exudado	Lesiones mecánicas en cortezas	Aromas, resinas, bálsamos
Destilación	Directa		Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Por arrastre con vapor (directo, indirecto, a presión, al vacío)		
	Destilación-Maceración (liberación enzimática de aglicomas en agua caliente)		Almendras, mostaza, ajo, hojas de abedul
Extracción con solventes	Solventes volátiles	En caliente	Infusiones y resinoides alcohólicos en caliente, oleorresinas
		En frío	Concretos y absolutos, resinoides en frío, oleorresinas
	Solventes fijos (grasas y aceites)	En caliente	Pomadas en caliente, lavados y absolutos de pomadas
		En frío	Pomadas en frío, lavados y absolutos de enflorados
Procesos de extracción con fluidos en condiciones subcríticas y supercríticas			

1.4. *Schinus molle* L.

1.4.1. UBICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Sapindales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Schinus*

Especie: *Schinus molle* L.

1.4.2. NOMBRES COMUNES

“Molle”, “Aguaribay”, “Pirwi”, “Pimiento boliviano” (Chile), “molle” (Argentina, Bolivia, Perú), “molli”, “aguaribay”, “huaribay”, “cuyash”, “falsa pimienta”, “kullakz” (Perú), “peruvian mastic” (U.S.A.), “pimiento de california” (Costa Rica), “anacahuita”, “aguaribay” (Uruguay), “pirul”, “falsa pimienta” (Bolivia) (FAO. 1998).

1.4.3. DESCRIPCIÓN GENERAL

Forma: Árbol perennifolio, de 4 a 8 m (hasta 15 m) de altura, con un diámetro de 25 a 35 cm.

Copa/Hojas: Copa redondeada y abierta, proporcionando sombra moderada. Hojas compuestas, alternas, de 15 a 30 cm de largo, colgantes, con savia lechosa; imparipinnadas de 15 a 41 foliolos, generalmente apareados, de 0.85 a 5 cm de largo, estrechamente lanceolados, color verde amarillento.

Tronco/Ramas: Tronco nudoso. Ramas flexibles, colgantes y abiertas.

Corteza: Corteza rugosa, fisurada, color marrón oscuro. Madera dura y compacta.

Flor(es): Panículas axilares en las hojas terminales, de 10 a 15 cm de largo, flores muy pequeñas y numerosas, de color amarillento, miden 6 mm transversalmente.

Fruto(s): Drupas en racimos colgantes, cada fruto de 5 a 9 mm de diámetro, rosados o rojizos, con exocarpo coriáceo, lustroso, seco en la madurez, mesocarpo delgado y resinoso, cada fruto contiene una o dos semillas.

Semilla(s): Las semillas poseen un embrión bien diferenciado que llena toda la cavidad: la testa y endospermo son delgados, el mesocarpo forma parte de la unidad de dispersión.

Raíz: Sistema radical extendido y superficial.

Sexualidad: Monoica.

Número cromosómico: $2n=28$ (Rzedowski, J. & Calderón de Rzedowski G. 1999)



FIGURA N°1. *Schinus molle* L. (molle).

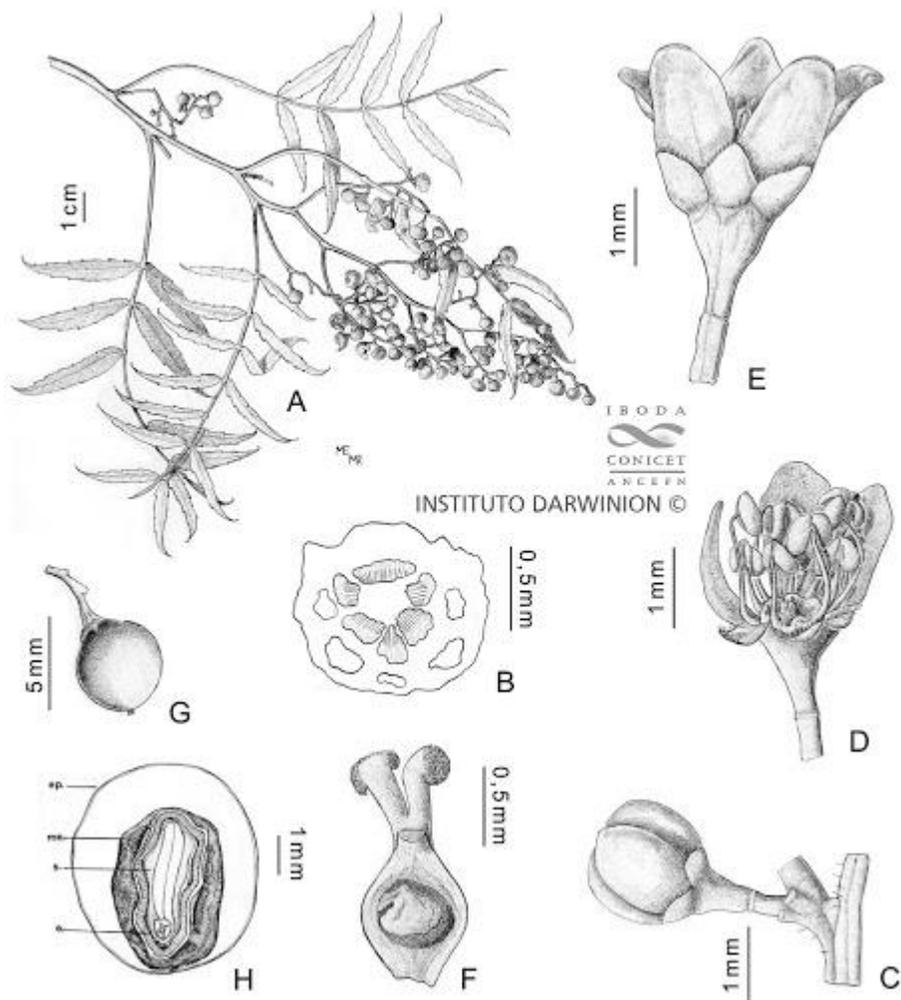


FIGURA N°2. *Schinus molle* L. (Instituto de Botánica Darwinion)

1.5. ACEITE ESENCIAL *Schinus molle* L.

El estudio fitoquímico de *Schinus molle* L. “molle” indica que contiene taninos, alcaloides, flavonoides, saponinas esteroidales, esteroides, terpenos y aceite esencial. El aceite esencial presente en las hojas contiene ácido behénico, bergamota, bicyclogermacreno, borneno, cadineno, cadinol, calacoreno, calamenediol, calamaneno, canfeno, carvacrol, ácido gálico, butirato de geraniol, limoneno, mirceno, ácido linoleico, ácido palmítico, entre otros. Poder antiséptico, propiedades antiespasmódicas y sedantes, estimulan la secreción gástrica por lo

que son digestivos y estomáquicos; estimulación uterina, antiinflamatorio en casos de cervicitis y vaginitis (Alba, A. et al. 2009). Como antimicrobiano en infecciones urinarias, antiinflamatorio en trastornos menstruales, antifúngico, descongestionante, purgante y analgésico para tratar dolores articulares, musculares, incluso para tratar el dolor dental (Rivadeneira D. & Álvarez P. 2015). El aceite esencial de *Schinus molle* L. no presenta toxicidad en animales ni en los seres humanos (Alba, A. et al. 2009).

1.6. ETNOBOTÁNICA

Con el zumo del fruto machacado se curten cueros. La madera se usa como materia prima para la fabricación de artesanías y muebles. La resina cuando se la quema desprende un olor muy grato. Sirve para elaborar jabón y como tinte. El fruto procesado se usa como antimicótico. El jugo blanco extraído de la corteza se usa como purgante y, aplicado externamente, reduce la inflamación de tumores, en especial de los ojos. El jugo de las ramas es purgante; la corteza se usa como purgante para las mulas. La infusión de la planta es útil para tratar la artritis y prevenir el resfrío. La planta es usada para tratar golpes. Las hojas se usan en baños o infusión, para tratar trastornos de la menstruación y cólicos; en emplasto, se aplican en fracturas e inflamaciones. Las hojas y frutos machacados, calman el dolor de piernas y de muelas. Las hojas en infusión, se usan para tratar dolencias del riñón (De la Torre L. et al. 2008).

1.7. DISTRIBUCIÓN

Árbol típicamente americano, originario de los valles interandinos del centro del Perú (FAO. 1998).

El *Schinus molle* L. es propio de las regiones cálidas y secas de Sudamérica. Vive en las laderas occidentales de la región interandina, vertientes occidentales de los andes peruanos, en la costa y en los valles. Su límite superior se encuentra en el centro y sur del Perú, alrededor de 3500 msnm. (Alba, A. et al. 2009).

Es una especie arbórea americana de gran difusión como ornamental en zonas áridas y semiáridas a nivel mundial. En Perú es una especie forestal típica de las estepas espinosas y de los bosques montanos bajos. Antiguamente el pimiento se encontraba en las cercanías del agua, ocupando extensas zonas del Centro y Sudamérica llegando hasta el Norte de Argentina. Actualmente su distribución se ha extendido por cultivo y asilvestramiento. En Chile crece desde la Región de Tarapacá en el extremo norte, hasta la Región Metropolitana en la zona central, aunque su rango de distribución se ha extendido más al sur debido a su cultivo. No forma asociaciones puras, encontrándose ejemplares aislados a lo largo de toda su distribución natural (FAO. 1998).

1.8. MICROBIOTA ORAL

La microbiota oral es un complejo ecosistema que contiene una amplia variedad de especies microbianas. La boca es colonizada por varios microorganismos antes de la erupción de los dientes, sin embargo, los recién nacidos son esencialmente libres de microorganismos. Con la erupción de los dientes, la placa dental se desarrolla en las superficies dentales expuestas las cuales están cubiertas por una película amorfa, casi invisible compuesta principalmente por glicoproteínas salivales. De no tomarse medidas de higiene oral, las superficies de los dientes acumulan grandes masas microbianas, mientras que la descamación de células epiteliales no permite la acumulación en las superficies de la mucosa oral (Ojeda J. *et al.* 2013).

La microbiota juega un papel fundamental en la inducción, la formación y la función del sistema inmune del huésped (Cruz S. *et al.* 2017). Cuando funciona de manera óptima la alianza, sistema inmune-microbiota, permite la inducción de respuestas protectoras a los patógenos y las vías de regulación implicados en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos inocuos.

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 (Ojeda J. *et al.* 2013).

Los seres humanos poseen una microbiota oral dominada por bacterias anaerobias, donde el número de bacterias en la cavidad bucal es de alrededor bacterias/g de placa dental y bacterias/ml de saliva (Serrano H. et al. 2015).

Las especies del género *Streptococcus* se encuentran en una alta proporción en tejidos blandos, saliva y en la lengua. Las especies del género *Actinomyces* se encuentran a nivel supragingival e infragingival y en fisuras de la lengua. Otras bacterias como *Veillonella parvula* y *Neisseria* pueden ser aisladas en todos los hábitats orales. También puede existir colonización intracelular en células epiteliales de la cavidad bucal por complejos bacterianos constituidos por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (Serrano H. et al. 2015; Cruz S. et al. 2017).

Los principales phylum aislados en la cavidad oral son: *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteriodes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. También se ha determinado que los géneros bacterianos presentes en ella son: *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema sp*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacterias*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium*. Siendo los más frecuentes *Prevotella*, *Selenomonas* y *Streptococcus*. Esta última se ha reportado como el género preponderante a nivel de esta cavidad y se han diferenciado más de 16 especies de esta bacteria, siendo las más frecuentes *S. mutans*, *S. intermedius*, *S. oralis* y *S. sanguinis* (Serrano H. et al. 2015).

La cavidad bucal está expuesta al entorno externo, por lo tanto, la microbiota también puede estar influenciada por factores externos como fumar o deficiente higiene bucal. Además, la presencia de enfermedades sistémicas como la obesidad se asocia con cambios en la microbiota de la saliva. Sobre la base de estas posibles conexiones con el estado de salud del huésped, la microbiota salival promete como un indicador sustituto para la vigilancia de la salud y el diagnóstico de enfermedades (Cruz S. et al. 2017).

1.8.1. BACTERIAS ASOCIADAS A LAS CARIES DENTALES

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 (biofilm) saludable a otra patológica (Ojeda J. et al. 2013). Costerton definió el biofilm como: «una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes» (Serrano J. & Herrera D. 2005).

Una biopelícula sana puede estar formada por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patogénicas (Ojeda J. et al. 2013).

La caries se desarrolla como resultado de un desequilibrio ecológico en la microbiota oral estable. Los microorganismos orales forman la placa dental sobre las superficies de los dientes, que es la causa del proceso de la caries, y muestra características de la biopelícula clásica. La formación de biopelículas parece estar influenciada por los cambios a gran escala en la expresión de proteínas en el tiempo y bajo control genético; los microorganismos cariogénicos producen los ácidos láctico, fórmico, acético y propiónico, que son un producto del metabolismo de hidratos de carbono. *Streptococcus mutans* y otros estreptococos del llamado grupo de los estreptococos no mutans, *Actinomyces* y *Lactobacillus* juegan un papel clave en este proceso. La biopelícula dental es una estructura metabólicamente dinámica y en constante actividad, en condiciones normales, estos procesos están en equilibrio y no se producen daños permanentes en la superficie del esmalte del diente (Cruz S. et al. 2017).

Para el inicio y progresión de la lesión de caries es esencial que las especies bacterianas involucradas tengan la habilidad de producir ácido (acidogénicas) y tolerar un medio de pH bajo (acidúricas). Además, debe considerarse también

la virulencia particular de especies capaces de producir polímeros de sacarosa, y otras especies que aprovechan esta matriz de polímeros para su adherencia y colonización. A través de, este mecanismo estas últimas especies estarían involucradas en el inicio de la lesión de caries dental (Figuroa M. et al. 2009). Los cambios en la composición de los biofilms se asocian con enfermedades bucales como caries dentales o periodontitis. Las comunidades están formadas por muchas y variadas interacciones entre diferentes especies y géneros dentro de la biopelícula, que incluyen asociaciones célula-célula, fenómenos físicos conocidos como coagregación, la señalización entre especies, la secreción y la rotación de compuestos antimicrobianos y el intercambio de una matriz extracelular. El centro de estas interacciones es la selección de sinergias metabólicas, y está cada vez más claro que la capacidad de las comunidades para extraer la máxima energía de los metabolitos disponibles es un factor potente para la estructura del biofilm y la estratificación (Cruz S. et al. 2017). Como se muestra en la Tabla N° 2, las especies microbianas predominantes son significativamente diferentes en los sitios de localización. Independientemente de las variaciones de muestra a muestra, estreptococos, bacilos Gram positivos comprenden la mayoría del total de recuentos viables. Observaciones clínicas en humanos y animales indican que la formación de placa es un requisito esencial tanto para la caries como para la enfermedad periodontal (Ojeda J. et al. 2013).

Tabla N° 2. Distribución de bacterias en varios sitios de la boca humana (Ojeda J. et al. 2013).

Grupo Bacteriano	Sitio			
	Placa	Lengua	Saliva	Surco
Gingival				
Cocos G+ Facultativos	28.2	44.8	46.2	28.8
Estreptococos	27.9	38.3	41.0	27.1
<i>S. mutans</i>	(0-50)	(0-1)	(0-1)	(0-30)
<i>S. sanguis</i>	(40-60)	(10-20)	(10-30)	(10-20)
<i>S. mitior</i>	(20-40)	(10-30)	(30-50)	(10-30)
<i>S. salivarius</i>	(0-1)	(40-60)	(40-60)	(0-1)
<i>S. milleri</i>	(3-25)	(0-1)	(0-1)	(14-56)
Estafilococos	0.3	6.5	4.0	1.7
Cocos G+ anaerobicos	12.6	4.2	13.0	7.4
Cocos G- anaerobicos	6.4	16.0	15.9	10.7
Cocos G- facultativos	0.4	3.4	1.2	0.4
Bacilos G+ facultativos	23.8	13.0	11.8	15.3
Bacilos G+ anaerobicos	18.4	8.2	4.8	20.2
Bacilos G- facultativos	ND ^b	3.2	2.3	1.2
Bacilos G- anaerobios	10.4	8.2	4.8	16.1
Espiroquetas	ND	ND	ND	1.0

Fuente: Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiological reviews. 1980 Jun;44(2):331–84.
 Los datos entre paréntesis son expresados como un porcentaje de los conteos totales de estreptococos facultativos.
 h ND. No detectado.

Se ha descrito un viraje en la población microbiana en la placa en desarrollo de preponderantes formas cocáceas en la placa temprana con un incremento de bacilos y formas filamentosas. Sin embargo, los estreptococos conforman el mayor número del total de la población bacteriana en la placa dental. Muchos de los estreptococos pueden ser identificados como una de las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, y *S. milleri*. 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 (Ojeda J. et al. 2013).

1.8.1.1. GÉNERO *Streptococcus*

Bacterias esféricas u ovoides que crecen en pares o cadenas de longitud variable. La mayoría son anaerobios facultativos, existiendo algunas especies anaerobios obligados. Son Gram positivos, no formadores de esporos, catalasa negativos e inmóviles, y tienen complejos y variables requerimientos nutricionales.

La infección estreptocócica es una de las más frecuentes, siendo algunos de los cuadros más importantes relacionados con el género: amigdalitis aguda, otitis media, sinusitis, neumonía, meningitis, infección del tracto urinario, infección abdominal o cutánea, etc. (Rodríguez G. 2015).

La clasificación depende de una combinación de características, incluyendo: patrón de hemólisis en placas de agar sangre, composición antigénica, características de crecimiento, reacciones bioquímicas y, más recientemente, análisis genético (Rodríguez G. 2015).

Cuando los estreptococos son cultivados en agar sangre se puede observar, además de la morfología macroscópica característica de cada cepa, la presencia de un halo transparente alrededor de la colonia donde los glóbulos rojos han sido completamente lisados. Este patrón es designado hemólisis de tipo beta y es de considerable importancia ya que la exhibe *Streptococcus pyogenes* y muchos otros *Streptococcus* patógenos humanos. Un segundo grupo de microorganismos, produce hemólisis parcial o hemólisis alfa,

observándose como un halo verdoso alrededor de la colonia; perteneciendo a este grupo *S. pneumoniae* así como otros *Streptococcus* que habitan el tracto respiratorio superior y gastrointestinal del hombre. Finalmente, el término hemólisis gamma se utiliza para designar aquellas especies que no producen hemólisis, aunque el término estreptococo no hemolítico es preferible. Una identificación más precisa de los estreptococos betahemolíticos fue creada por Rebecca Lancefield. Esta clasificación en serogrupos está basada en las diferencias antigénicas de los carbohidratos de la pared celular. Los antígenos de grupo son rápidamente extraíbles de la pared celular e identificables por reacciones de precipitación usando antisueros específicos. Los estreptococos que carecen de antígeno de grupo reconocible son identificados por características fenotípicas (reacciones de fermentación, producción de enzimas) y por hibridación del DNA (Rodríguez G. 2015).

En la actualidad se reconocen aproximadamente 30 especies de *Streptococcus*; siendo algunas de las especies de mayor importancia en patología humana: *S. pyogenes* (estreptococo del grupo A), *S. agalactiae* (estreptococo del grupo B), y *S. pneumoniae* (neumococo) (Rodríguez G. 2015).

Tabla N°3. Principales serogrupos de *Streptococcus* en enfermedad humana (Rodríguez G. 2015).

Serogrupo	Antígeno grupo específico de la pared celular	Aspectos clínicos
A	Ramnosa-N-acetil-glucosamina	Faringitis, amigdalitis, escarlatina, erisipela, impétigo, celulitis, secuelas no supurativas: fiebre reumática, glomerulonefritis
B	Ramnosa-glucosamina	Corioamnionitis, sepsis puerperal y neonatal, meningitis neonatal
C	Ramnosa-N-acetil-galactosamina	Infecciones respiratorias altas
D	Ácido glicerol teicoico	Infecciones del tracto genitourinario, heridas, endocarditis
G	Ramnosa-galactosamina	Infecciones respiratorias altas, celulitis, sepsis

A. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. Normalmente no desamina la arginina para producir amoníaco. Usualmente no producen ni hemólisis ni decoloración en agar sangre, es principalmente alfa o gamma hemolítico en agar sangre de cordero, aunque se han reportado unas pocas cepas hemolíticas. *Streptococcus mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *S. mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas. Aunque *S. mutans* no se distribuye ampliamente en animales salvajes, se ha aislado en monos, murciélagos, ratas salvajes habitantes de campos de cultivo de caña

de azúcar y de monos Rhesus. Igualmente, se ha aislado en ratas y hámsteres de experimentación (Ojeda J. *et al.* 2013).

Clasificación de *Streptococcus mutans*:

Con base en la composición y los enlaces de los polisacáridos de la pared celular, estreptococos del grupo mutans se pueden clasificar en 8 serotipos: *Streptococcus mutans* (serotipos c, e, f y k), *Streptococcus sobrinus* (serotipos d y g), *Streptococcus cricetus* (serotipo a), *Streptococcus rattus* (serotipo b), *Streptococcus ferus* (serotipo c), *Streptococcus macacae* (serotipo c) y *Streptococcus downei* (serotipo h). Se sabe que el serotipo c de *S. mutans* es el tipo predominante en la cavidad oral humana más que las cepas e, d, f y k (Ojeda J. *et al.* 2013).

Los polisacáridos de la pared celular juegan un papel importante en la colonización de sus nichos ecológicos. Las diferencias en las afinidades para la unión de los antígenos de polisacáridos a los tejidos humanos pueden ser la causa de esta distribución tan variada. Por otro lado, se cree que el progenitor de *S. mutans* haya sido el serotipo c y que las cepas f y e pueden haberse originado por mutaciones del determinante del serotipo c (Ojeda J. *et al.* 2013).

Streptococcus mutans generalmente es conocido como patógeno dental e igualmente se considera que causa bacteremia y endocarditis infecciosa. Previamente se ha clasificado en tres serotipos c, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos específicos de los serotipos los cuales están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Recientemente se designó una cepa de *S. mutans* con serotipo no c/e/f como serotipo k el cual se caracteriza por una drástica reducción en la cantidad de cadenas laterales de glucosa. Un rasgo biológico común del serotipo k es su bajo nivel de

cariogenicidad debido a las alteraciones de varios de los mayores antígenos proteicos de superficie (Ojeda J. *et al.* 2013).

En cuanto a la virulencia en sangre, estas cepas sobreviven en la sangre por mayor tiempo debido a su baja antigenicidad. Otros estudios revelan la participación de este serotipo en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares, en la cuales se ha detectado su alta frecuencia (Ojeda J. *et al.* 2013).

1.8.2. HONGOS ASOCIADOS A INFECCIONES BUCALES

Las enfermedades provocadas por hongos han incrementado su frecuencia y su importancia clínica, a causa del aumento del uso de drogas inmunosupresoras potentes en trasplantes, en terapia anticancerosa y por la aparición de infecciones virales que causan inmunodeficiencia (VIH).

La moniliasis o candidiasis de la mucosa bucal (CMB) es una de las enfermedades más frecuentes de la mucosa bucal y, sin dudas, la afección micótica más común en esta localización. La magnitud de la infección micótica depende fundamentalmente de las condiciones del hospedero, pues el establecimiento del padecimiento ocurre cuando se perturban los parámetros de equilibrio fisiológico que mantienen la homeostasia del medio bucal.

La especie más importante desde el punto de vista médico odontológico como agente etiológico de infección es la *Candida albicans*, aunque de la cavidad bucal han sido aisladas otras especies como son: *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, *Candida tropicalis*, *Candida seudotropicalis*, *Candida stellatoidea*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis* y *Candida guilliermondii* (Rodríguez J. *et al.* 2002).

1.8.2.1. GÉNERO *Candida*

Los hongos del género *Candida* son habitantes habituales en boca, sistema gastrointestinal, piel y vagina, por lo que se consideran agentes infecciosos endógenos específicos. Son poco virulentos, no son

transmisibles y solo producen infección de la mucosa en presencia de una predisposición local o general manifiesta o ambas, de ahí que sean considerados hongos oportunistas.

Candida crece mejor en superficies húmedas y templadas, por lo que es causa frecuente de vaginitis, dermatitis del pañal y muguet bucal. (Rodríguez J. *et al.* 2002)

A. *Candida albicans*

es un hongo habitual que se encuentra en el ser humano en la boca, intestino, incluso en los órganos genitales, pero cuando hay alteración del sistema inmune y otros factores aumenta este hongo y aparecen en esas zonas en mayor cantidad

C. albicans fue el patógeno más frecuentemente encontrado tanto sola (62 %) como en combinación con otras especies de *Candida* (31 %) en un estudio realizado por Saag y otros, 16 en una serie de 74 pacientes VIH positivos, en EE. UU; Patton y otros, 17 en ese mismo país, comunicaron una prevalencia del 20 % de CMB en 238 pacientes adultos infectados (Rodríguez J. *et al.* 2002).

Las especies de *Candida* son patógenos oportunistas que podría asociarse con los atributos de virulencia del organismo y también los factores del huésped. Hay varios tipos de candidiasis orofaríngea que incluyen pseudomembranoso agudo (aftas), atrófico agudo, y queilitis angular (Maheronnaghsh. M. *et al.* 2016).

1.9. EVALUACIÓN DE DOSIS LETAL 50 (DL 50) DE LAS PLANTAS MEDICINALES

El aceite esencial de los frutos del *Schinus molle* L. fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) a 0,4% para el experimento se diluyó 0,01 ml del aceite en 0.4 ml del DMSO y se aforó a 100 ml con una solución de cloruro de sodio al 3,6% (Chávez J. *et al.* 2014).

Se atemperan unas horas los quistes de A. salina y se pesan 0.1 g.

Se depositan en 300 mL agua de mar sintética (40 g de sal de mar, 6 mg de levadura de cerveza, ajustar a pH 7.8, aforar a 1 L) en una cámara de eclosión, con un lado oscuro y otro iluminado (bombilla eléctrica de 20 W), dividida con un pequeño orificio, se mantiene por 24 h con aeración constante a 22-29 °C (Loruhama S.*et al.* 2016).

Las artemias eclosionadas se separan y mantienen a las mismas condiciones por 48 h. Se colocan una microplaca de 96 pozos con 100 µL de agua de mar en cada pozo más 10 nauplios, se depositan 100 µL de los extractos para tener una concentración final de 100, 250, 500, 750 y 1000 µg/mL y como control negativo agua de mar artificial y positivo KMnO₄ a 400 µg/mL, se incuban a las mismas condiciones por 24 h (Loruhama S.*et al.* 2016).

Se cuentan los nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio y se hace el análisis estadístico PROBIT para determinar la DL₅₀ (McLaughlin, 1991). El criterio de toxicidad es el establecido por (Déciga-Campos *et al.*, 2007) se consideran: valores superiores a 1000 µg/mL como no tóxicos, los menores de 1000 pero mayores de 500 µg/mL ligeramente tóxicos y los menores a 500 µg/mL tóxicos (Loruhama S.*et al.* 2016).

La dosis letal – 50 (DL₅₀) del aceite esencial del *Schinus molle* L. es de 51.71 ppm, siendo tóxico, por lo que podría ser utilizado como excelente potencial biocida en el control de insectos (Chávez J. *et al.* 2014).

1.10. ANTECEDENTES

Loyola D. (2019). Evaluó la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de hojas de coca y molle al 50% y 75% frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Concluyendo que, el extracto etanólico de hojas de coca y molle al 50% y 75%, sí presentan una actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Zambrano A. (2019). Evaluó la actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial del fruto maduro de *Schinus molle* L. (Molle) frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Concluyendo que el AE a 40 y 60% no presentó actividad, a 80 y 100% presentó actividad antimicótica frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Ramírez R. & Soto R. (2018). Evaluaron la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) comparada con el Ciprofloxacino sobre cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™). Concluyeron que el aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli*.

Calcin S. (2018). Determinó la eficacia antimicrobiana in vitro del aceite esencial del *Schinus molle* L. en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Concluyendo que el aceite esencial del *Schinus molle* L. en las concentraciones de 100% y 75% tuvo mayor efecto antibacteriano para *Streptococcus mutans*, mientras que la concentración inhibitoria mínima (CIM) fue de 6.87mg/ml.

Alfaro M. & Ruiz M. (2018). Evaluaron el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de *Schinus molle* (molle) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante la determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). La CIM se obtuvo al 40% y la CMB al 60% del extracto acuoso S. molle (molle). Hubo diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$).

Gómez E. (2017). Evaluó el efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Schinus molle* (Molle) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Concluyendo que el extracto alcohólico de *Schinus molle* tiene efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* en todas las concentraciones evaluadas. No hubo diferencia significativa entre el efecto mostrado por el extracto frente al control positivo gluconato de clorhexidina al 0.12%.

Clemente C. & Paucar R. (2017). Evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “molle”; concluyendo que el extracto de *Schinus molle* L. presenta actividad antimicrobiana sobre *Streptococcus mutans* “ATCC 25175” y el gluconato de clorhexidina es cualitativamente similar a dicho extracto.

Rivadeneira D. & Álvarez P. (2015). Evaluaron el potencial antimicrobiano del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) sobre *Streptococcus mutans*; concluyeron que existió un potencial efecto antimicrobiano del aceite esencial de S. molle sobre la cepa bacteriana y en cuanto al gluconato de clorhexidina, fue cualitativamente similar al aceite.

Asto R. (2014). Evaluó el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Schinus molle* L. frente a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), obtuvo como resultados para cada cepa bacteriana en CMI y CMB 12.5 µL/ml y 50 µL/ml en *Escherichia coli*, 50 µL/ml para *Pseudomonas aeruginosa* en ambos casos, 12.5 µL/ml para *Staphylococcus aureus* en ambos casos, finalmente 25 µL/ml y 50 µL/ml para *Enterococcus faecalis*. Siendo la cepa más sensible la de *Staphylococcus aureus*.

Cedamanos I. & Mejía E. (2014). Determinaron el efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de *Schinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, concluyendo que la concentración mínima inhibitoria es 25%; con la técnica

de Kirby y Bauer la bacteria es resistente y las concentraciones tienen efecto inhibitorio.

Chávez J.; Lizárraga V. & Vargas E. (2014). Caracterizaron las propiedades físico-químicas del aceite esencial del fruto del *Schinus molle* L. (perfil cromatográfico-espectroscópico) y la dosis letal 50 (DL50) sobre la *Artemia salina*. Indicando que el aceite del molle está compuesto fundamentalmente por hidrocarburos terpénicos en un 90%, mirceno, felandreno, limoneno, cimeno y pineno; en menor proporción terpenoides y sesquiterpenos; mientras que con respecto a la DL50 al realizarse en nauplios de *Artemia salina* a 29°C en 24 horas, disolver el aceite en DMSO (dimetil sulfóxido) y analizándolo por PROBIT se llegó a determinar que la DL50 =50.75 ppm, lo cual indica que dicho aceite puede ser utilizado como potencial insecticida biodegradable.

Moncada F. (2013). Determinó la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de Arequipa y Moquegua contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Concluyendo que el aceite esencial de *Schinus molle* L tiene un efecto intermedio contra bacterias gram-positivas y un efecto resistente frente a bacterias gram-negativas.

Saravia N. & Guillinta G. (2012). Compararon la actividad antifúngica del extracto de etanol *Schinus molle* y el fluconazol sobre *Candida albicans*. Obteniendo como resultados que el extracto de *Schinus molle* mostró actividad antifúngica con 25µg/ml, con un halo de inhibición ≥20mm, y el fluconazol con 25 µg/ml con un halo de inhibición de ≥31mm. (p=0.0001). Finalmente concluyeron que el extracto etanólico de *Schinus molle* utilizando las hojas de la planta con 25 µg/ml presentó un halo de inhibición de ≥20 mm mostrando así actividad antifúngica frente a cepas clínicas de *Candida albicans* ATCC 10231.

Cruz A. et al. (2010). Evaluaron efecto antibacteriano in vitro de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*; los cuales,

fueron sometidos a un análisis microbiológico in vitro, para establecer su actividad antibacteriana y sus concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida, en respuesta a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*. Compararon el extracto con un fármaco estándar, cloranfenicol o gentamicina. Y finalmente demostraron que las plantas seleccionadas tienen actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.

Zampini I.; Cudmani N. & Isla M. (2007). Determinaron la potencia antimicrobiana de extractos alcohólicos de plantas utilizadas popularmente en Argentina como antisépticos y antiinflamatorios: *Dasyphyllum diaconthoides*, *Erythrina cristagalli*, *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Phytolacca dioica*, *Pithecoctenium cynanchoides*, *Prosopanche americana*, *Schinus molle*, *Schkuhria pinnata*, *Senna aphylla* y *Solidago chilensis*. Para la inhibición del crecimiento bacteriano utilizaron ensayos de difusión en agar, macrodilución en medio sólido y microdilución en medio líquido frente a 47 aislamientos clínicos multirresistentes a antibióticos, obtenidos de pacientes de un hospital de Tucumán, Argentina: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Obteniendo concentración inhibitoria mínima (CIM), tres de las once especies ensayadas fueron las más activas: *L. divaricata*, *L. cuneifolia*, y *S. aphylla* (CIM de 25 a 200 µg/mL). *P. mirabilis*, *A. baumannii* y *S. maltophilia* fueron las cepas más susceptibles con valores de CIM entre 25 y 50 µg/mL seguido por *P. aeruginosa* con valores de CIM de 50 a 100 µg/mL. Los valores de concentración bactericida mínima (CBM) fueron semejantes o dos veces superiores a los valores de CIM. Finalmente comprobaron que los extractos más activos presentaban al menos dos principios antimicrobianos, concluyendo que los resultados obtenidos justifican el uso de estos extractos para el tratamiento de infecciones bacterianas, especialmente aquellas de origen dérmico.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2. METODOLOGÍA

2.1. MUESTRAS BIOLÓGICAS

2.1.1. CEPAS: BACTERIANA Y FÚNGICA

La cepa bacteriana empleada *Streptococcus mutans* Clarke ATCC® 25175 se obtuvo del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Católica de Santa María, mientras que la cepa fúngica *Candida albicans* (Robin) Berkhout ATCC® 90028 se obtuvo del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín.

2.2. ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* L.

2.2.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial fue obtenido en el Departamento de Química en el laboratorio de Química Orgánica, para lo cual se utilizó frutos maduros de *Schinus molle* L. recolectados previamente al finalizar la primavera del 2019 del distrito de José Luis Bustamante y Rivero – Arequipa (Perú); primero se procedió al lavado del material vegetal con agua potable para eliminar impurezas del ambiente; consecutivamente se dejó secar el material vegetal a temperatura ambiente, y con ayuda de un molino triturador, se desintegró homogéneamente el material obtenido e inmediatamente se pesó.

Luego se llevó a destilación por arrastre con vapor, durante dos horas aproximadamente, utilizando para este proceso el equipo “Clevenger”, el cual está compuesto de un balón, de donde se deposita la materia prima sólida y una cantidad de agua pura, aportando calor constantemente, de modo que el aceite esencial y el agua presente se evaporen continuamente;

un condensador va acoplado al balón y una conexión en forma de “D” que permitió acumular y separar el aceite esencial de la mezcla condensada, el cual se enfrió a temperatura ambiental y se depositó en un frasco ámbar, previamente esterilizado; finalmente se almacenó en un refrigerador hasta su uso ulterior.

2.3. AISLAMIENTO DE BACTERIAS Y HONGOS

Para el aislamiento de *S. mutans* se emplearon tubos con caldo nutritivo peptonado o BHI el cual fue incubado durante 18-24 horas y posteriormente se sembró en placas Petri con agar específico para esta cepa (Mitis Salivarius o Bacto m Enterococcus) y se rotularon convenientemente, dicho procedimiento se realizó con el asa de siembra previamente esterilizada, con la cual se tomó una pequeña muestra de las colonias del cultivo inicial en el tubo con caldo y se sembró en forma de estrías.

En el caso de *C. albicans* se emplearon también tubos con caldo nutritivo, los cuales se incubaron durante 18-24 horas, para después sembrarlas de la misma manera que en el anterior procedimiento, en placas Petri con agar Sabouraud o con agar OGYE y finalmente rotularlas.

2.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Schinus molle* L.

2.4.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN

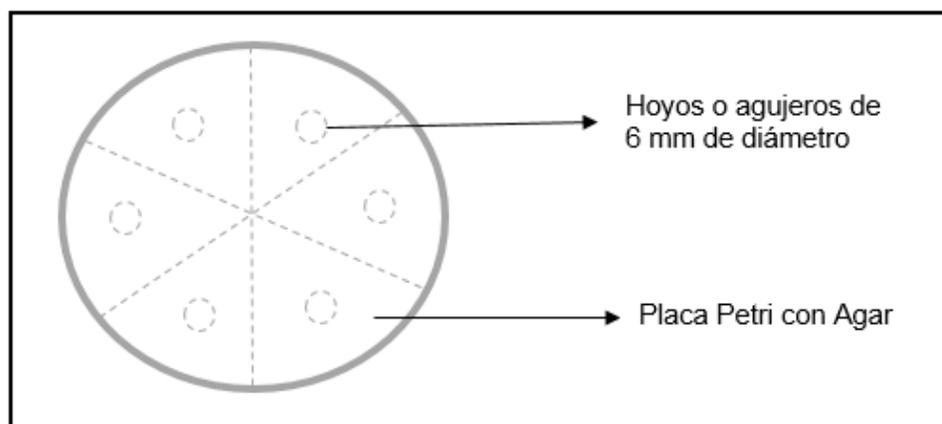
Coger de 3 a 5 colonias iguales de la placa de cultivo de 18 a 24 horas y sembrarlas en 2 o 5 ml de un medio líquido (Brain-Heart, Todd Hewitt, Tripticasa soja, etc.) e incubar en la estufa a 35°C durante 2 a 6 horas hasta conseguir o superar una turbidez del 0.5 de la escala de MacFarland. Si la turbidez es superior se realiza el ajuste necesario con suero salino estéril. Antes de que transcurran 15 minutos de haber ajustado el inóculo, introducir un escobillón o asa de Kolle dentro de la suspensión y al retirarlo rotar varias

veces contra la pared del tubo por encima del nivel del líquido con la finalidad de eliminar el exceso de inóculo (García J. et al 2000).

A. DIFUSIÓN HOYO-PLACA

Para esta técnica, la cual está basada en el método de Kirby-Bauer, en placas previamente preparadas con agar apropiado para cada muestra, *S. mutans* (Agar Bacto m Enterococcus) y *C. albicans* (Agar OGYE) se realizaron 6 hoyos o agujeros de 6 mm de diámetro aproximadamente con un sacabocados, teniendo como guía un molde realizado en una hoja bond el cual se colocó debajo de la placa con el agar, se verificó que no hubiera algún remanente en cada hoyo realizado; habiendo esperado el tiempo necesario para la obtención de la turbidez del 0.5 de MacFarland, se procedió a introducir una torunda o hisopo esterilizado, el cual se empapó completamente para posteriormente deslizarlo por toda la superficie de las placas con agar tres a cuatro veces rotando la placa y culminando con la periferia del agar, con lo cual se obtuvo una siembra uniforme (Ramírez L. & Castaño D. 2009)..Después se dejó secar 5 minutos para depositar en cada hoyo realizado, 10 µL, 20 µL, 30 µL, 50 µL, 75 µL y 100 µL de aceite esencial de *Schinus molle* L. Este procedimiento fue el mismo tanto para *S. mutans* como para *C. albicans*. Finalmente se incubaron las placas de 16-18 horas (García J. et al. 2000).

Gráfico N°1. Distribución de los hoyos en la placa Petri para la prueba por difusión.



2.4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

La CMI fue interpretada como la concentración de antimicrobiano, contenida en el tubo de la serie que inhibió el crecimiento visible de la bacteria, para lo cual fue necesario comparar cada uno de los tubos con los controles positivo y negativo. (Horna G. *et al.* 2005)

A. MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO

PROCEDIMIENTO

a) Preparación de la solución madre.

Las concentraciones a evaluar fueron de 200 μ L/ml para *S. mutans* y de 100 μ L/ml para *C. albicans*.

La solución madre se preparó de acuerdo a la máxima concentración evaluada de aceite, de forma que se encuentre en proporción 2:1 de aceite y disolvente (Tween 80) además de agua peptonada.

Haciendo uso de una micropipeta de 100-1000 μ L se midieron volúmenes para cada tubo de acuerdo a los siguientes pasos (Asto R. 2014):

Concentración de 200 μ L/ml

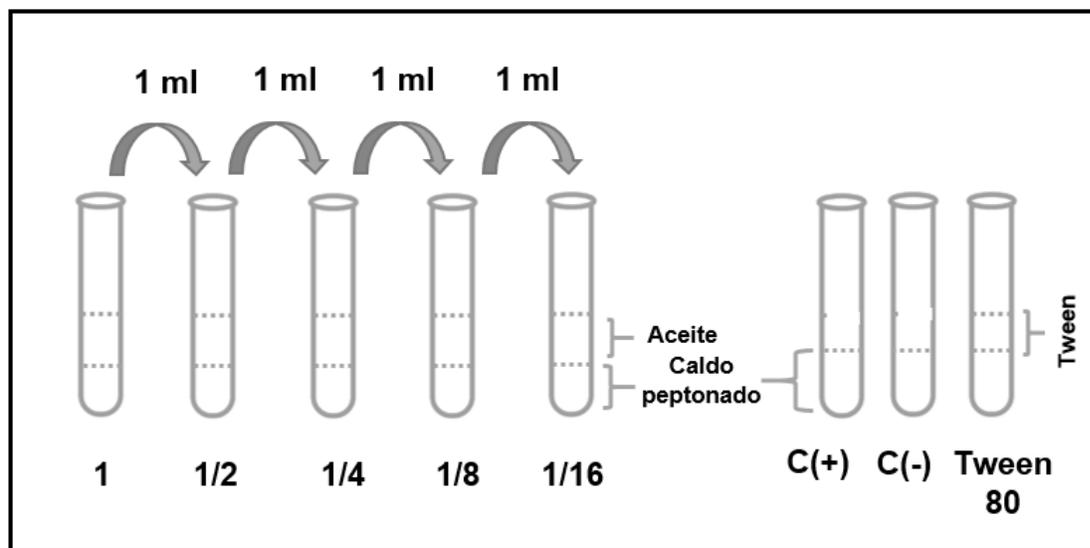
i. Se midió 400 μ L de aceite esencial de molle en un tubo de ensayo estéril.

- ii. Se agregó 200 μ L de disolvente (Tween 80) y se homogenizó.
- iii. Se añadió 1400 μ L de caldo nutritivo y se volvió a homogenizar. Se obtuvo una solución de aspecto lechoso, cuyo volumen final fue de 2ml a una concentración de 200 μ L/ml.

Concentración de 100 μ L/ml

- i. Se midió 200 μ L de aceite esencial de molle en un tubo de ensayo estéril.
- ii. Se agregó 100 μ L de disolvente (Tween 80) y se homogenizó.
- iii. Se añadió finalmente 1700 μ L de caldo nutritivo y se volvió a homogenizar. Se obtuvo una solución de aspecto lechoso, cuyo volumen final fue de 2ml a una concentración de 100 μ L/ml.

Gráfico N°2. Realización de las diluciones



b) Preparación de las diluciones.

Candida albicans

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
DILUCIÓN	1	1/2	1/4	1/8	1/16	C(+)	C(-)	TWEEN 80
ACEITE	100	50	25	12.5	6.25	---	---	---
CALDO PEPTONADO (ml)	SOLUCIÓN MADRE	1	1	1	1	1	1	1
INÓCULO (μ l)	25	25	25	25	25	25	---	25

S.mutans

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
DILUCIÓN	1	1/2	1/4	1/8	1/16	C(+)	C(-)	TWEEN 80
ACEITE	200	100	50	25	12.5	---	---	---
CALDO PEPTONADO (ml)	SOLUCIÓN MADRE	1	1	1	1	1	1	1
INÓCULO (μ l)	25	25	25	25	25	25	---	25

CAPÍTULO III

RESULTADOS

El aceite esencial obtenido de los frutos de *Schinus molle* L. mostró actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans*, y *Candida albicans*; todo esto fue corroborado por los métodos realizados en esta investigación, tales como concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) y sensibilidad.

3.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).

TABLA N°1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DEL ACEITE ESENCIAL DE LOS FRUTOS DE *Schinus molle* L. (MOLLE) FRENTE A *Streptococcus mutans*.

TUBO		1	2	3	4	5
DILUCIÓN []		1	1/2	1/4	1/8	1/16
ACEITE (µL)		200	100	50	25	12.5
N° DE REPETICIONES		3	3	3	3	3
CMI	% DE CRECIMIENTO	0	75	100	100	100
CMB	% DE CRECIMIENTO	75	100	100	100	100

En la Tabla N° 1, se observa que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L. frente a *Streptococcus mutans* fue de 100 µL/ml de aceite, mientras que la CMB fue de 200 µL/ml de aceite.

3.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (CMF).

TABLA N°2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (CMF) DEL ACEITE ESENCIAL DE LOS FRUTOS DE *Schinus molle L.* (MOLLE) FRENTE A *Candida albicans*.

TUBO		1	2	3	4	5
DILUCIÓN []		1	1/2	1/4	1/8	1/16
ACEITE (µL)		100	50	25	12.5	6.25
N° DE REPETICIONES		3	3	3	3	3
CMI	% DE CRECIMIENTO	0	0	10	25	50
CMF	% DE CRECIMIENTO	0	15	25	50	75

La **Tabla N° 2** muestra que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle L.* frente a *Candida albicans* fue de 25 µL/ml, mientras que la concentración mínima fungicida (CMF) fue de 50 µL/ml.

3.3. SENSIBILIDAD

TABLA N°3. SENSIBILIDAD DE *Streptococcus mutans* FRENTE AL ACEITE ESENCIAL DE LOS FRUTOS DE *Schinus molle L.* (MOLLE).

<i>Streptococcus mutans</i>	10 µL	20 µL	30 µL	50 µL	75 µL	100 µL
Media (mm)	15,67	18,00	20,33	22,33	25,33	30,00
Desviación	4,04	3,61	3,51	2,08	0,58	1,00
Varianza	16,33	13,00	12,33	4,33	0,33	1,00
Máximo	20,00	22,00	24,00	24,00	26,00	31,00
Mínimo	12,00	15,00	17,00	20,00	25,00	29,00
CANTIDAD DE MUESTRA	3	3	3	3	3	3

Fuente: Elaboración Propia.

f=10.19

P<0.05

P=0.00

La Tabla N° 3 según el análisis de la varianza ($f=10.19$) muestra que la sensibilidad de *Streptococcus mutans* frente a las distintas concentraciones del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle L. (MOLLE)* presentaron diferencia estadística significativa ($P<0.05$).

Asimismo, se observa que el halo inhibitorio más grande, corresponde a 31 mm, siendo sumamente sensible al aceite esencial de cantidad 100 μL ; demostrando que se puede clasificar de 20 μL a 100 μL como muy sensible o sumamente sensible, ya que sus halos van de 15 a 31 mm; y el de 10 μL corresponde a una sensibilidad límite.

TABLA N° 4. COMPARACIONES MULTIPLES POR TRATAMIENTO

TRATAMIENTOS		
(VOLÚMENES DE ACEITE)	MEDIA	GRUPO
10 μL	15,67	a
20 μL	18,00	a
30 μL	20,33	a
50 μL	22,33	a
75 μL	25.33	b
100 μL	30.00	c

Fuente: *Elaboración Propia.*

Según la prueba de Tukey por tratamientos, se observaron 3 grupos, considerando con mayor eficacia el tratamiento de 100 μL que es superior con una media de 30.00 mm a 75 μL con 25.33 mm de media, y a su vez superior a 10, 20, 30 y 50 μL , considerándose sensibles o muy sensibles según la escala de Duraffourd. (Esto

demuestra que al grupo “a” pertenecen 10, 20, 30 y 50 μL , por tanto, estadísticamente son resultados similares)

TABLA N° 5. SENSIBILIDAD DE *Candida albicans* FRENTE AL ACEITE ESENCIAL DE LOS FRUTOS DE *Schinus molle* L. (MOLLE).

<i>Candida albicans</i>	10 μL	20 μL	30 μL	50 μL	75 μL	100 μL
Media (mm)	11,67	15,00	21,00	26,67	29,00	32,67
Desviación	1,53	2,00	5,20	5,77	4,36	2,52
Varianza	2,33	4,00	27,00	33,33	19,00	6,33
Máximo	13,00	17,00	24,00	30,00	32,00	35,00
Mínimo	10,00	13,00	15,00	20,00	24,00	30,00
CANTIDAD DE MUESTRA	3	3	3	3	3	3

Fuente: Elaboración Propia.

f=13.25 P<0.05 P=0.00

La Tabla N° 5 según el análisis de la varianza (f=13.25) muestra que la sensibilidad de la cepa *Candida albicans* frente a los distintos tratamientos del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L. (MOLLE) presentaron diferencia estadística significativa (P<0.05).

A partir de 30.00 mm demuestra que es sumamente sensible lo que corresponde de 75 μL a 100 μL , considerando sensibilidad límite (media) o muy sensible a los tratamientos de 20, 30, 50 μL .

TABLA N° 6. COMPARACIONES MÚLTIPLES POR TRATAMIENTO

TRATAMIENTOS		
(VOLÚMENES DE ACEITE)	MEDIA	GRUPOS
10 µL	11,67	a
20 µL	15,00	a
30 µL	21,00	a
50 µL	26,67	b
75µL	29,00	b
100 µL	32,67	c

Fuente: *Elaboración Propia.*

Según la prueba de Tukey se observa que los tratamientos de 10, 20 y 30 µl presentan menor resistencia a *Candida albicans*, se podría utilizar los tratamientos de 50 y 75 µL y estos serían estadísticamente iguales, observando también que el tratamiento de 100 µL presenta un promedio de 32.67 mm de halo con lo que demostraría que es sumamente sensible, según la escala de Duraffourd.

DISCUSIÓN

En la investigación realizada se determinó el efecto antimicrobiano del aceite del molle frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, ambos microorganismos implicados en procesos infecciosos dentales y bucales; para corroborar si el aceite en estudio presentaba actividad antimicrobiana se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite para *S. mutans*, correspondiendo a 100 $\mu\text{L/ml}$, esto quiere decir que a esta concentración fue en la que ya no se observó crecimiento bacteriano, sin embargo en el estudio realizado por Cedamanos I. & Mejía E. en el año 2014, obtuvieron que su concentración mínima en la cepa de *S. mutans* fue 25%, lo cual indica que a una pequeña concentración dicha cepa bacteriana se inhibe; al comparar con el resultado obtenido en este estudio podemos decir que la cepa utilizada por Cedamanos & Mejía 2014, era menos resistente al aceite del molle. Del mismo modo Calcín S. 2018, obtuvo que la CMI fue 6.87 mg/ml, nuevamente indicando que dicha concentración es menor a la que se obtuvo en el presente estudio. La posible razón por la que la cepa utilizada en esta investigación presenta resistencia, puede deberse a que, al ser observada en el microscopio óptico, se logró denotar la presencia de una capa o membrana que rodeaba cada bacteria, con lo cual se podría inferir que dicha envoltura le otorga protección y por ende los antibióticos o cualquier sustancia de similar acción, no lograrían penetrar con facilidad y, consecuentemente, inhibirla o en todo caso eliminarla, por otro lado también podría darle la propiedad de adherirse o agruparse a otras bacterias; tal como lo explica Valero P. 2015, las proteínas de unión a glucanos, son proteínas de la envoltura celular, presentes en *S. mutans* (Gbps A-D) intervienen en la capacidad de agregación y formación de biopelículas. Por otro lado, Bojanich M. 2013, indica que la pared celular de *Streptococcus mutans*, está constituida por un polímero denominado peptidoglicano o mureína, junto con ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos cuya función es la de protección frente a la lisis osmótica; mientras que Palmer S. *et al* 2018 mencionan que las proteínas YidC del cariogénicopatógeno *Streptococcus mutans* son necesarios para una adecuada biogénesis de la envoltura y virulencia, lo que indica que estas proteínas también pueden contribuir a una biopelícula óptima formación en estreptococos; por ende es posible que estas proteínas producidas generen una envoltura resistente.

Por otra parte, la CMI frente a la cepa *Candida albicans* corresponde a 25 µL/ml, lo cual significa que a esa concentración se observó la ausencia de crecimiento de dicha levadura, contrastando con el estudio de Saravia N. & Guillinta G. del año 2012, obtuvieron 25 µg/ml la cual es una cantidad menor al presente estudio realizado, esto podría indicar que la cepa de *C. albicans* es menos resistente al aceite del molle. Asimismo, en la investigación realizada por Moran J. en el 2009, obtuvo que la CMI fue de 12,49 mg/ul, que, a pesar de estar expresado en distintas unidades, corresponde a una cantidad mucho menor a la encontrada en este estudio. Del mismo modo, Maheronnaghsh M. *et al.* 2016, realizaron su investigación con fluconazol, un antimicótico, obteniendo diecisiete (47,2%) de los aislamientos fueron susceptible a fluconazol (CMI ≤ 8 µg / ml), 17 (47,2%) fueron resistentes al fluconazol (CMI ≥ 64 µg / ml), y 2 (5,6%) fueron sensibles a la dosis, con lo cual podríamos inferir que estos resultados difieren bastante con los obtenidos en el presente estudio, lo cual depende de las técnicas aplicadas y también del antimicótico utilizado.

La concentración mínima fungicida (CMF) del aceite, observada 24 horas después, para *Candida albicans* fue de 50 µL/ml; sin embargo, en la investigación de Morán J. en el año 2009 la CMF fue de 12,60 mg/ul, que equivale a una cantidad mucho menor a la obtenida en el presente estudio; esto podría deberse a distintos factores, entre los cuales destacan las condiciones en las cuales trabajó y los procedimientos utilizados. A su vez, Maheronnaghsh M. *et al.* 2016, en su investigación realizada con fluconazol, obtuvieron que la MIC y MFC de cada uno estaba en un rango de 0,25 a 128 µg / ml, siendo resultados drásticamente diferentes, como ya se mencionó, debido a que los medios y sustancias utilizadas son distintas.

Cabe destacar que en algunos trabajos no se observan resultados de CMB o de CMF como en el caso de *Streptococcus mutans* y sólo un pequeño número para *Candida albicans*, lo cual puede deberse a que no se contó con el tiempo suficiente para su realización, o quizás a que no fue planteada en sus objetivos; no obstante, es notable mencionar que la consideración de este parámetro es de suma importancia, debido a

que, podría utilizarse para futuros estudios, y aplicarlos en sustancias como los fármacos cuyo componente principal o secundario sea el aceite esencial del molle.

En cuanto a la sensibilidad bacteriana encontrada en este trabajo para *Streptococcus mutans* se presentó en los volúmenes de 20 a 100 μL , lo cual indica que, a esas pequeñas cantidades, *S. mutans* es sensible e impide su crecimiento; el tamaño del halo inhibitorio varía considerablemente en relación directa a la cantidad del aceite de molle, del mismo modo los resultados obtenidos por Calcin S. en el año 2018, están en un rango de 7 a 10 mm lo que significaría que la sensibilidad es mucho menor a la hallada en el presente estudio.

Para *Candida albicans* se encontró que la mayor sensibilidad al aceite de molle se dio en los volúmenes de 75 y 100 μL , en cambio en el trabajo de Zambrano A. del 2019, se encontró que la sensibilidad fue nula ya que sus valores fueron menores a los establecidos por Duraffourd, según las concentraciones utilizadas 40% y 60%, sin embargo para las concentraciones de 80% y 100% de aceite de molle encontró que el microorganismo sí presentó sensibilidad, demostrando que los resultados distan notablemente de los realizados en el presente estudio, asimismo, al contrastar los resultados obtenidos con los de Zegarra P. en el 2018, se puede aseverar que obtuvo que las concentraciones de 10 % y 20 % de aceite de molle, tiene actividad antifúngica, y a su vez nos indica que dichos valores son menores a los encontrados en esta investigación.

Finalmente cabe destacar que la metodología utilizada en este trabajo puede influir en la obtención de los resultados, puesto que la tecnología y los métodos empleados no son muy avanzados, sino que se realizaron con procedimientos tradicionales.

CONCLUSIONES

1. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L. (molle) frente a *Streptococcus mutans* fue de 100 $\mu\text{L/ml}$ y frente a *Candida albicans* fue de 25 $\mu\text{L/ml}$.
2. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial los frutos de *Schinus molle* L. (molle) frente a *Streptococcus mutans* fue de 200 $\mu\text{L/ml}$ y frente a *Candida albicans* fue de 50 $\mu\text{L/ml}$.
3. La sensibilidad frente al aceite esencial de los frutos de *Schinus molle* L. (molle) de *Streptococcus mutans* se presentó en los volúmenes de 20 a 100 μL y *Candida albicans* en los volúmenes de 75 y 100 μL .

RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios en diluciones adicionales del aceite de molle, para obtener los resultados de CMI y CMB, y así compararlos con los de la presente investigación.
2. Aislar microorganismos de diferentes cavidades humanas y posteriormente efectuar los procedimientos pertinentes para comprobar la susceptibilidad al aceite de molle.
3. Utilizar procedimientos con tecnología avanzada, para obtener resultados más exactos.
4. Realizar fármacos con propiedades antimicrobianas utilizando el aceite del molle como uno de los componentes, ya sea en enjuagues bucales o en pasta de dientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alba A.; Bonilla P. & Arroyo J. 2009. Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. “molle” en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Ciencia e Investigación; 12(1): 29-36. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3384>
2. Alfaro M. & Ruiz M. 2018. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de *Schinus molle* (molle) sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. REBIOL 2018; 38(1): 4 – 16. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/2145>
3. Araiza M. 2001. Efecto de extractos de plantas medicinales sobre el crecimiento, la producción de enterotoxina y la esporulación de *Clostridium perfringens*. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias con especialidad en microbiología. Facultad de Ciencias biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. 1-79. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/7159/1/1080080867.PDF>
4. Aricapa D. 2009. Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas. Carrera Bacteriología. Bogotá. 1-147.
5. Asto R. 2014. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Schinus molle* L. frente a bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) y Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212). Tesis para optar el título de biólogo. 1-54.
6. Azaña I. 2010. Efectividad Antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis griseb* (muña) sobre bacterias prevalentes en patologías periapicales crónicas de origen endodóntico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Odontología. 1-168. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/2183>
7. Azuero A.; Jaramillo C.; San Martin D. & D'Armas H. 2016. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Revista Ciencia UNEMI. Vol. 9, N° 20, pp. 11 – 18. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342>

8. Barroso E. 2009. Interacciones de los polifenoles del vino con la microbiota de la cavidad bucal humana. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Biotecnología y Microbiología de los Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación. 1-48.
9. Bermúdez M.; Granados F. & Molina A. 2019. Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Psidium guajava* y *Cymbopogon citratus*. Agron. Mesoam. 30(1):147-163.
10. Bojanich M. 2013. Estudio del comportamiento de cepas autóctonas de *Streptococcus mutans* en diferentes localizaciones de la caries dental. 1-108. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/6798/bojanich%20maria%20alejandraCC.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
11. Calcin S. 2018. Efecto antibacteriano del aceite esencial del *Schinus molle* L. sobre las cepas de *Streptococcus mutans* estudio in vitro. Arequipa. Para optar el título profesional de cirujano dentista. 1-103.
12. Cedamanos I & Mejía E. 2014. Efecto inhibitorio in vitro del aceite esencial de *Schinus molle* L. “molle” sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Pueblo cont. vol. 25[2].
13. Cerpa M. 2007. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Universidad de Valladolid. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. 1-304.
14. Chávez J.; Lizárraga V. & Vargas E. 2014. Caracterización físico química del aceite esencial del fruto del *Schinus molle* L. y la dosis letal 50 (DL₅₀) sobre la *Artemia salina*. Revista Agustina NATURAL SCIENCE 2(1):43-46.
15. Clemente C. & Paucar R. 2017. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “molle”. Tesis para optar el Título Profesional de químico farmacéutico.
16. Cruz A.; Rodríguez N. & Rodríguez C. 2010. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 13 (2):117-124.

17. Cruz S.; Díaz P.; Arias D. & Mazón G. 2017. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Rev Cubana Estomatol.*; 54(1).
18. Cueva L. 2016. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Citrus limón* sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Ciencias Biológicas. 1-39.
19. Déciga-Campos M.; Rivero-Cruz I.; Arriaga-Alba M.; Castañeda-Corral G.; Angeles-López G.; Navarrete A. & Mata R. 2007. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 110 (2):334-42. Epub.
20. Dellacassa E. 2010. Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la Flora Aromática Latinoamericana. Proyecto CYTED IV.20. 1-337.
21. De la Torre L.; Navarrete H.; Muriel P.; Macía M. & Blaslev H. 2008. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus. Quito & Aarhus.
22. Domingo D. & López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterp*; Vol. 16 (Nº4): 385-393.
23. FAO. 1998. Especies Arbóreas y Arbustivas para las Zonas Áridas y Semiáridas de América Latina. *Schinus molle*. Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
(http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/redes/sisag/arboles/Chischi.htm#:~:text=El%20Schinus%20molle%20se%20encuentra,en%20el%20sur%20de%20Europa.)
24. Figueroa M.; Alonso G. & Acevedo A. 2009. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odontológica Venezolana*. Volumen 47, No. 1.
25. García C. 2006. Actividad antimicrobiana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Tesis para optar doctorado en ciencias agropecuarias. Universidad Agraria Antonio Narro. México. 1-124.
26. García J.; Cantón R.; García E.; Gómez M.; Martínez L.; Rodríguez C. & Vila J. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 1-54.

27. Gómez E. 2017. Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Schinus molle* (Molle) SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis para obtener el título profesional de cirujano dentista. Facultad de ciencias médicas. Universidad César Vallejo. 1-112.
28. GREBO. 2010. Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100 – S20. SECRETARIA DISTRITAL DE SALUD. GRUPO PARA EL CONTROL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA DE BOGOTÁ. 1-78.
29. Guala M.; Elder H.; Pérez G. & Chiesa A. 2009. Evaluación del Poder Antioxidante de Fracciones de Aceite Esencial Crudo de *Schinus molle* L. obtenidas por Destilación al Vacío. Información Tecnológica Vol. 20(2), 83-88. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642009000200011
30. Guevara J.; Fuertes C.; Valencia E.; Guevara J.; Zerpa R.; Béjar V.; Patiño L. & Celis J. 2012. Acción in vitro de diez plantas medicinales sobre diez cepas diferentes de *Streptococcus pneumoniae*. An Fac med. 73(4):281-3.
31. Herrera M. 1999. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica) vol.34 suppl.0 San José.
32. Horna G.; Silva M.; Vicente W. & Tamariz J. 2005. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Rev Med Hered 16 (1), 39-45. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007
33. Huarino M. & Ramos D. 2013. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre flora salival mixta. Odontol. Sanmarquina 2013; 16(1):32-35. Disponible en: <http://ateneo.unmsm.edu.pe/handle/123456789/3595>
34. Hurtado A.; Bojórquez Y.; Montañón M. & López J. 2016. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. Oral; 17 (54): 1374-1378.
35. Iannaccone, J. & L. Alvarino. 2010. Toxicidad de *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) a cuatro controladores biológicos de plagas agrícolas en el Perú. Acta Zool. Mex.

(n.s.),26(3):603-615.

Disponible

en:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0065-17372010000300007

36. Llanos C.; Monteza C. & Scotto C. 2012. Determinación de la concentración letal media (CL50) y eficacia del eugenol como anestésico sobre *Xiphophorus helleri* (Heckel, 1848) (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). Rev Inv Vet Perú 2012; 23 (4): 429-440.
37. Loruhamá S.; Sánchez E. & García P. 2016. Investigación en plantas de importancia médica. Actividad antimicrobiana. OmniaScience. 1-453.
38. Loyola D. 2019. Actividad antibacteriana de hojas de *Erythroxylum coca* Lam. (COCA) y *Schinus molle* L. (MOLLE) frente a *Streptococcus mutans* cepa ATCC 25175. Tesis para optar el título profesional de cirujano dentista. Universidad Nacional Federico Villareal.
39. Maheronnaghsh M.; Tolouei S.; Dehghan P.; Chadeganipour M. & Yazdi M. 2016. Identification of *Candida* species in patients with oral lesion undergoing chemotherapy along with minimum inhibitory concentration to fluconazole. Adv Biomed Res 5:132. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5025917/pdf/ABR-5-132.pdf>
40. Malbrán C. 2012. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. M07-A9 Vol. 32 No. 2 Replaces M07-A8 Vol. 29 No. 2: 1-48. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
41. Marcén J. 2000. Antimicrobianos naturales. Medicina naturista N°2:104-108. I.S.S.N.: 1576-3080.
42. Mendiburu C.; Peñaloza R.; Chuc Baas I. & Medina S. 2017. Enfermedades pulpares y periapicales en estructuras dentales permanentes en pacientes con edades de seis-catorce años. Revista Cubana de Estomatología; 54 (3): 1-10.
43. Moncada F. 2013. Determinación de la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) de Arequipa y Moquegua contra *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Para optar el título profesional de ingeniero biotecnólogo. Disponible en: http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UCSM_1b7ddedc1b939b4f7fac93eeac_b369a7

44. Morán J. 2009. Determinación de la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Schinus molle* L. (molle) frente a *Candida albicans*. Tacna.
45. Núñez D. & García L. 2010. Bioquímica de la caries dental. Revista Habanera de Ciencias Médicas: 9 (2) 156-166.
46. Ojeda J.; Oviedo E. & Salas L. 2013. *Streptococcus mutans* y caries dental. Revista CES Odontología 26(1) 44-56.
47. Olmos P.; Piovesan S.; Musto M.; Lorenzo S.; Álvarez R. & Massa F. 2013. Caries dental. La enfermedad oral más prevalente Primer Estudio poblacional en jóvenes y adultos uruguayos del interior del país. Odontoestomatología / Vol. XV. Nº Especial: 26-34.
48. Palmer S.; Ren Z.; Hwang G.; Liu Y.; Combs A.; Söderström B.; Vásquez P.; Khosravi Y.; Brady L.; Koo H. & Stoodley P. 2018. Streptococcus mutans yidC1 and yidC2 Impact Cell Envelope Biogenesis, the Biofilm Matrix, and Biofilm Biophysical Properties. American Society for Microbiology. Journal of Bacteriology. Volume 201, Issue 1. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/JB.00396-18>
49. Pedraza D. & Hernández Y. 2006. Diseño y valoración de un medio de cultivo selectivo (SULBAC) para *Streptococcus mutans*. Trabajo para optar el grado de bacteriólogo(a). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bacteriología. Colombia. 1-114. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8821>
50. Pimentel E.; Castillo D.; Quintana M.; Maurtua D.; Villegas L. & Díaz C. 2015. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. Rev Estomatol Herediana. 25(3):268-77. Disponible en: <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/REH/article/view/2736>
51. Puerto J.; García P.; Márquez A.; García L. & Mira J. 2001. Candidiasis orofaríngea. Rev Diagn Biol vol.50 no.4.
52. Quert R.; Miranda M.; Leyva B.; García H. & Gelabert F. 2001. Rendimiento de aceite esencial en *Pinus caribaea* Morelet según el secado al sol y a la sombra. III. Rev Cubana Farm; 35(1):47-50.

53. Ramírez L. & Castaño D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* Año XV, No 42: 263-268. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
54. Ramírez A.; Isaza G.; Pérez J. & Martínez M. 2017. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del *Solanum Dolichosepalum* Bitter (Frutillo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*; 22(1).
55. Ramírez R. & Soto R. 2018. Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*Schinus molle* L.) frente a cepas de *Escherichia coli* in vitro. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Universidad Inca Garcilaso de la Vega Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica. 1-134.
56. Raventós R.; García R. & Pazos M. 2015. Estudio in vitro del efecto bactericida del aguacate. Instituto Superior de Ciencias Médicas Carlos J. Finlay. Camagüey, Cuba. 1-7.
57. Rivadeneira D. 2015. Potencial biosida del aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle) frente al gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans*, principal agente cariogénico. Estudio in vitro. Universidad Central Del Ecuador Facultad De Odontología. 1-89. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4982/1/T-UCE-0015-164.pdf>
58. Rivadeneira D. & Álvarez P. 2015. Aceite esencial de *Schinus molle* L. (Molle) como potencial antimicrobiano sobre *Streptococcus mutans*. estudio in vitro. KIRU. 12(2):8-14.
59. Robles T. 2014. Efecto biocida de *Schinus molle* L. "molle" (Anacardiaceae) para el control de *Erosina hyberniata* Guenée 1858 (Lepidoptera: Geometridae) en estado larval, plaga del *Tecoma stans* (L.) C. Juss. Ex Kunth. (Bignoniaceae) en el Distrito de Miraflores. Facultad de ciencias biológicas. Universidad Ricardo Palma. 1-97. Disponible en: <https://repositorio.urp.edu.pe/handle/urp/1001>
60. Rodríguez J.; Miranda J; Morejón H. & Santana J. 2002. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. Ciudad de La Habana *Rev Cubana Estomatol* 39(2): 187-233.
61. Rodríguez G. 2015. Géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*. TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA. 273-290.

62. Rzedowski, J. & Calderón de Rzedowski G. 1999. Anacardiaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo 78. 1-52.
63. Saravia N. & Guillinta G. 2012. Actividad antifúngica del extracto de etanol *Schinus molle* y el fluconazol sobre *Candida albicans*. Kiru 9 (1): 39-41.
64. Shiva C. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis Doctoral. Departament de Sanitat i d' Anatomia Animals. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona. 1-184.
65. Sieber C. 2012. Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta. Universidad de Chile. Facultad de Odontología. Departamento de Odontología Restauradora. Departamento Patología. 1-63.
66. Trinchitella A. 2006. Importancia de la salud oral y su conexión con la salud general. BIOMEDICINA, 2 (3) - 246-251.
67. Valero P. 2015. Bacterias de interés odontológico. Universidad de Murcia. 1ª edición. ISBN: 978-84-16038-91-6. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=uhQ0CwAAQBAJ&pg=PA9&lpg=PA9&dq=en+envoltura+en+streptococcus+mutans&source=bl&ots=bp449ycrrQ&sig=ACfU3U3CHaRkwWRdkwL4ewfll19SDaOUvA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjCqagwhvvyAhVvILkGHVghD0IQ6AF6BAg5EAM#v=onepage&q=en%20envoltura%20en%20streptococcus%20mutans&f=false>
68. Verde M.; García S. & Rivas C. 2016. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40.
69. Zambrano A. 2019. Actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial del fruto maduro de *Schinus molle* L. (Molle) frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Universidad Norbert Wiener.
70. Zampini I.; Cudmani N. & Isla M. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Acta Bioquím Clín Latinoam; 41 (3): 385-93.

71. Zapater M.; Alemán M.; Lozano E.; Aquino V.; Flores C.; Gil M.; Villada J & Araya G. 2018. Aspectos reproductivos de *Schinus areira* (Anacardiaceae). Bol. Soc. Argent. Bot. 53 (4): 619-631.
72. Zarate J.; Castañeda E.; Cuevas J.; Carrillo C.; Mendoza E. & Serrato M. 2018. Concentraciones e intervalos de aplicación del aceite esencial de *Tagetes lucida* Cav. contra *Nacobbus aberrans*. 9(3): 589-600. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6452280>
73. Zegarra P. 2018. Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de hojas de *Schinus molle* L. frente a cepas de *Candida albicans*. Para optar el título profesional de químico farmacéutico. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/10565>
74. Serrano J. & Herrera D. 2005. La placa dental como biofilm. ¿Cómo eliminarla? RCOE, Vol 10, N°4, 431-439. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1138-123X2005000400005

ANEXOS

1. Constancia de identificación de la especie vegetal en estudio:



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N° 093-2019-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

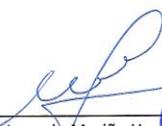
HACE CONSTAR:

Que la muestra seca del espécimen presentada por **María Alejandra Velásquez Sánchez** Bachiller de la Escuela Profesional de Biología Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, para la realización de su tesis "**Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de frutos de *Schinus molle* L (Molle) frente a *Streptococcus mutans* y *Candida albicans***". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico seco, para su determinación en el *Herbarium Arequipense* (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Reino	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Genero	<i>Schinus</i>
Especie	<i>Schinus molle</i> L

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 27 de noviembre del 2019.


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR

Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ



2. Hábito y morfología general de *Schinus molle* (molle):

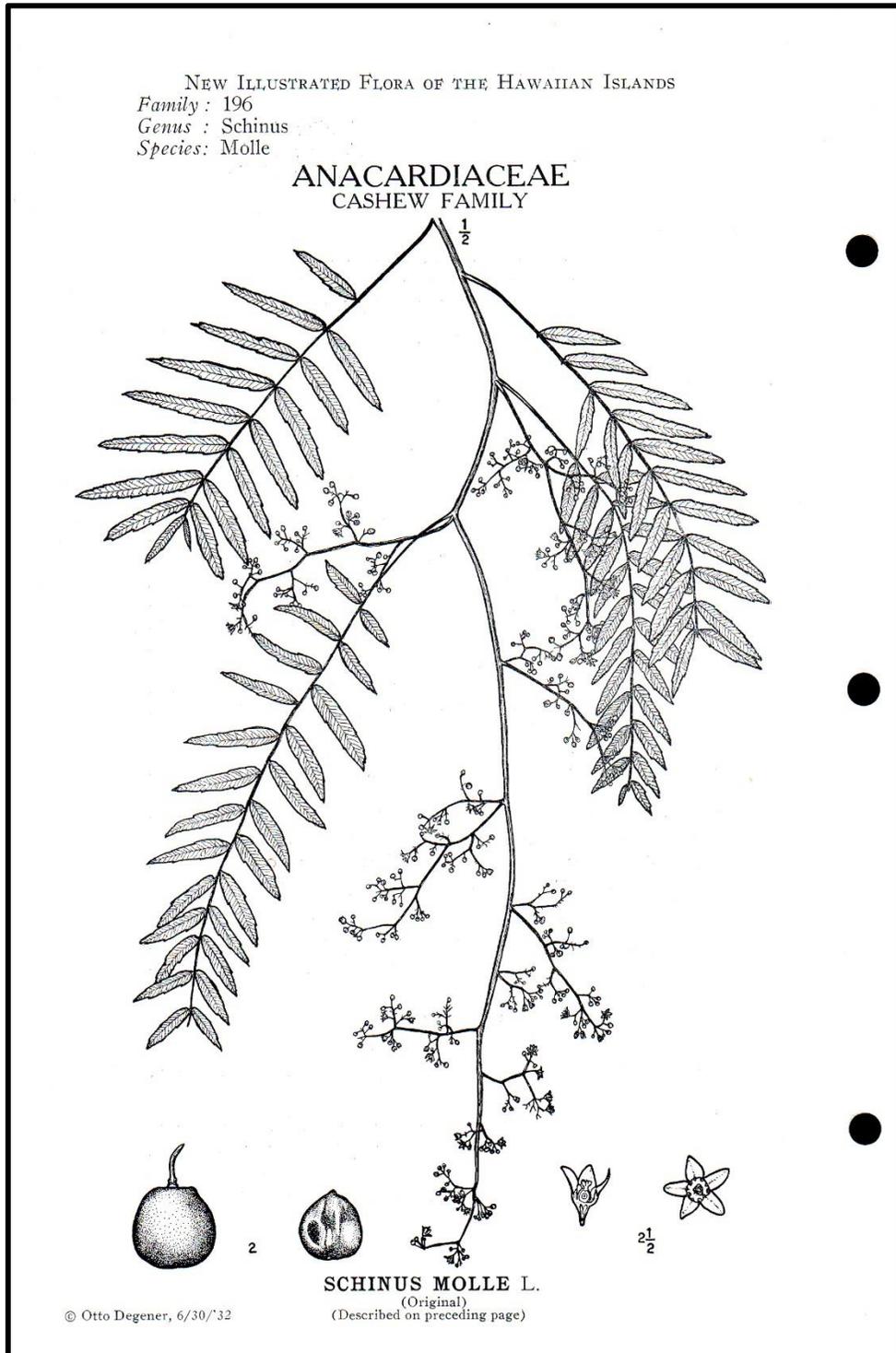


Fig 1. Ilustración de las partes principales de *Schinus molle* L., mostrando una rama florífera con la morfología de hojas, flores y fruto (drupa). Fuente: Otto Degener.

3. Estructura y morfología del fruto de *Schinus molle* L.

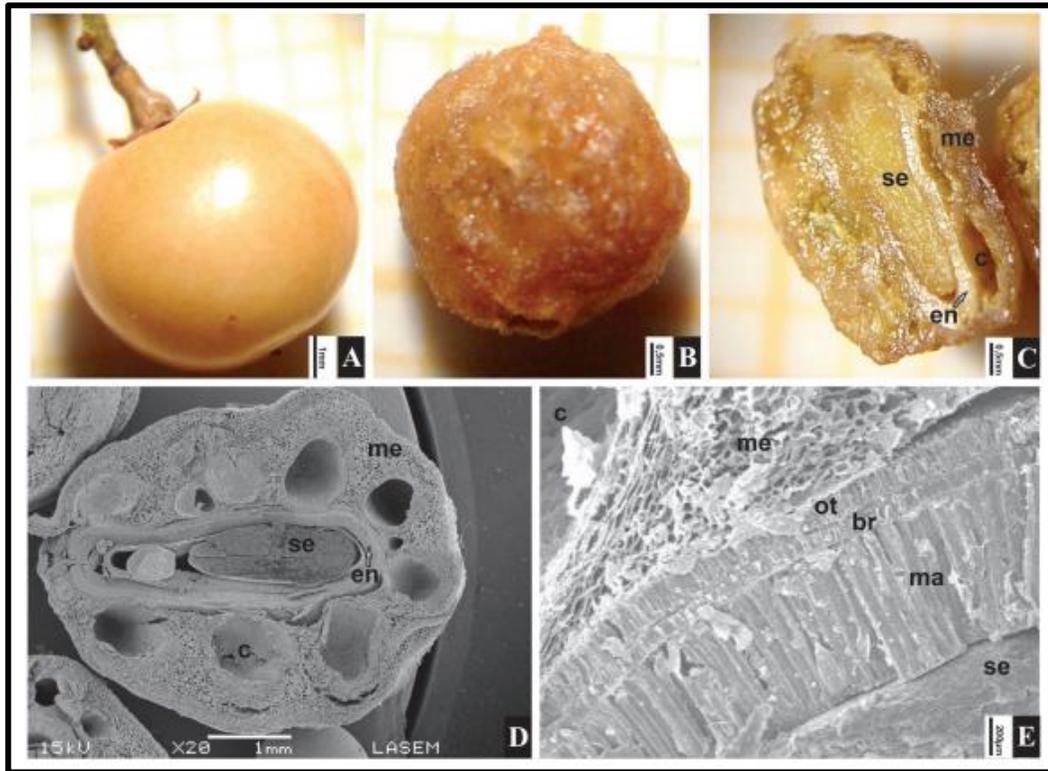


Fig 2. **A:** Drupa con exocarpo. **B:** Drupa sin exocarpo. **C:** Drupa, corte transversal. **D:** Drupa, corte transversal (MEB). **E:** Detalle del endocarpo con las tres capas de esclereidas en empalizada (MEB). Abreviaturas: br: braquiesclereidas; c: conducto resinífero; en: endocarpo; ma: macroesclereidas; me: mesocarpo; ot: osteoesclereidas; se: semilla. Escala = A, D: 1 mm; B-C: 0,5 mm; E: 200 μm (A-C: fotos de V. Aquino). (Fuente: Zapater M. *et al.* 2018.)

4. Obtención del aceite de *Schinus molle* L.



Fig 3. A. Selección de frutos de *Schinus molle* L. B. Triturado de los frutos en un molino. C. Equipo de extracción tipo Clevenger, para la obtención del aceite esencial por arrastre de vapor de agua. D. Frasco esmerilado el cual contiene el aceite esencial obtenido. (Fuente: Elaboración propia)

5. Rendimiento del aceite del fruto de *Schinus molle* L.

Fórmula para hallar el rendimiento de un aceite esencial:

$$P = \frac{M_1}{M_2} \times 100$$

M₁ es la masa final del aceite esencial

M₂ es la masa inicial del follaje (frutos u hojas)

$$P = \frac{12,2247 \text{ g}}{700 \text{ g}} \times 100$$

$$P = 1,746 \%$$

6. Reactivos y medios de cultivo:

Agar Mitis Salivarius:

Se utiliza para el aislamiento de *S. mitis*, *S. salivarius* y *Enterococcus* en un entorno de laboratorio. El Agar Mitis Salivarius, está destinado a ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos.

Fórmula	Litro
Digerido enzimático de caseína	15 g
Digerido enzimático de tejido animal	5 g
Sacarosa	50 g
Dextrosa	1 g
Fosfato dipotásico	4 g
Azul de tripán	0,075 g
Cristal violeta	0,0008 g
Agar	15 g

pH final: $7,0 \pm 0,2$ a 25°C

Suplemento: Suplemento de telurito (1%) Chapman (Telurito de potasio 100 mg)

1. Suspender 90 g del medio en un litro de agua purificada.
2. Calienta con agitación frecuente y hervir durante un minuto para disolver completamente el medio.
3. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.
4. Enfriar el medio estéril a $50-60^{\circ}\text{C}$ y añadir asepticamente 1 ml del suplemento de telurito (1%) Chapman (#7989).

Agar m. Enterococcus: Slanetz – Bartley TTC

Composición	
Triptona	20,00 g
Extracto de levadura	5,00 g
Glucosa	2,00 g
Fosfato dipotásico	4,00 g
Azida sódica	0,40 g
TTC	0,10 g
Agar-Agar	12,00 g

pH final: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C

TTC (2,3,5 – Triphenyl Tetrazolium Chloride). (Fórmula por litro)

1. Disolver 43,5 g de medio en un litro de agua bidestilada.
2. Calentar, agitando hasta ebullición para su total homogenización.
3. Evitar el excesivo calentamiento y enfriar rápidamente. No autoclavar. El color final del medio es incoloro-paja. El medio rojo indica que ha sufrido exceso de calor.

Deshidratado: Polvo fino, amarillo.

Preparado: Estéril, Rosado

Agar Mueller-Hinton:

El medio de cultivo Mueller-Hinton es un medio líquido nutritivo utilizado para el estudio de la sensibilidad de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas frente a agentes antimicrobianos. Se utiliza como medio de cultivo para efectuar la técnica de antibiograma con el método de dilución o como medio básico para preparar un inóculo bacteriano.

El medio Mueller-Hinton se prepara según la fórmula descrita por la W.H.O.

Composición	
Infusión de carne de buey deshidratada	2 g
Hidrolizado de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
pH final	7,3 ± 0,1

Ca ²⁺	20-25 mg/L
Mg ²⁺	10-12,5 mg/L

Las variaciones de pH, de concentración de cationes divalentes o/y de timidina pueden ocasionar diferencias en los resultados obtenidos.

1. Homogeneizar el polvo que contiene el frasco.
2. Mezclar 25 gramos de medio deshidratado en 1 litro de agua recién destilada hasta la obtención de una suspensión homogénea. Esterilizar en el autoclave a 121°C ± 1°C durante 15 minutos. Repartir en tubos o frascos estériles.

Caldo Nutritivo:

La peptona de gelatina y el extracto de carne proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento.

Composición	
Peptona de gelatina	5 g
Extracto de carne	3 g

pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C

1. Suspender 8 gramos de medio en un litro de agua destilada.
2. Mezclar bien y disolver calentando con agitación frecuente.
3. Hervir durante un minuto hasta disolver por completo.
4. Dispensar el medio en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar OGYE:

Oxyltetracycline-Glucose-Yeast Extract Agar (OGYE)

Composición	
Extracto de levadura	5,0 g
Glucosa	20,0 g
Agar-Agar	20,0 g

pH final: 7,2 ± 0,2 a 25°C

Suplemento: Oxitetraciclina

1. Disolver 45 g en 1 litro de agua destilada, llevar a ebullición y agitar para su completa disolución.
2. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.
3. Enfriar a 50 °C aprox. y añadir asepticamente 100mg/litro de oxitetraciclina esterilizada por filtración.

Agar Sabouraud

El agar Sabouraud se usa para el aislamiento y cultivo de hongos. Aporta elementos esenciales (peptonas y glucosa) que promueven el crecimiento de hongos.

Composición	
Peptonas	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g

1. Homogenizar el polvo contenido en el frasco.
2. Añadir 42 gramos de medio deshidratado a un litro de agua destilada estéril.
3. Esperar 5 minutos, luego mezclar hasta que se obtenga una suspensión homogénea. Calentar suavemente, agitando con frecuencia y luego calentar hasta hervir y que se consiga la disolución completa.
4. Si es necesario, ajustar el pH a 5,8. Esterilizar en el autoclave a 121°C durante 20 minutos y dispense en tubos o en placas de Petri.

El tiempo de incubación varía de acuerdo con la naturaleza de la muestra y la especie de hongo sospechada.

7. CMI y CMB en *Streptococcus mutans*:



Fig 4. CMI (Concentración mínima inhibitoria) en *S.mutans*. (Fuente: Elaboración propia)

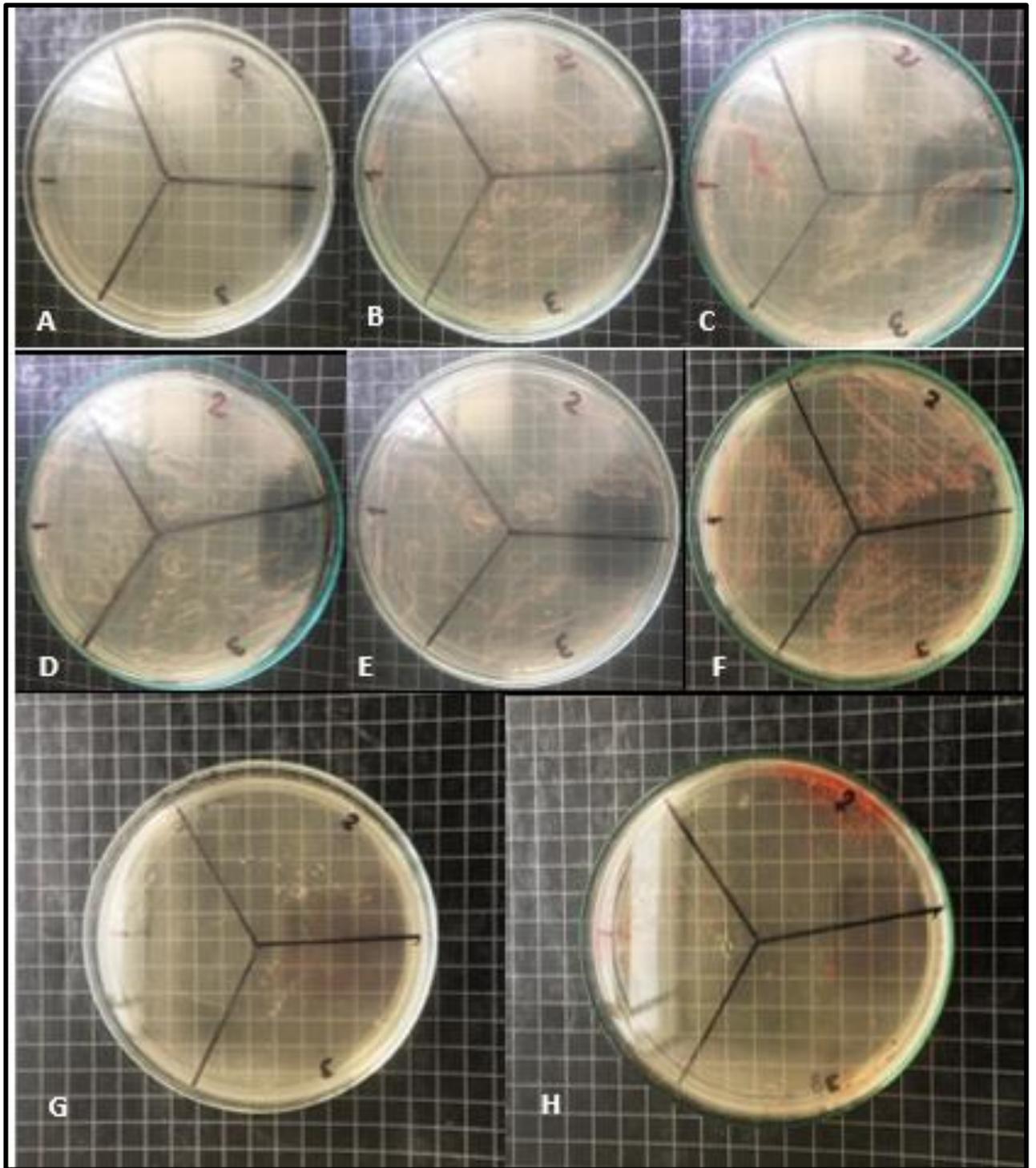


Fig 5. CMB (Concentración mínima bactericida) en *S. mutans*. **A:** Concentración 1 (). **B:** Concentración 2 (). **C:** Concentración 3 (). **D:** Concentración 4 (). **E:** Concentración 5 (). **F:** Control (+). **G:** Control (-). **H:** Tween 80 (Fuente: Elaboración propia)

8. CMI y CMB en *Candida albicans*:



Fig 6. CMI (Concentración mínima inhibitoria) en *C. albicans*. (Fuente: Elaboración propia)

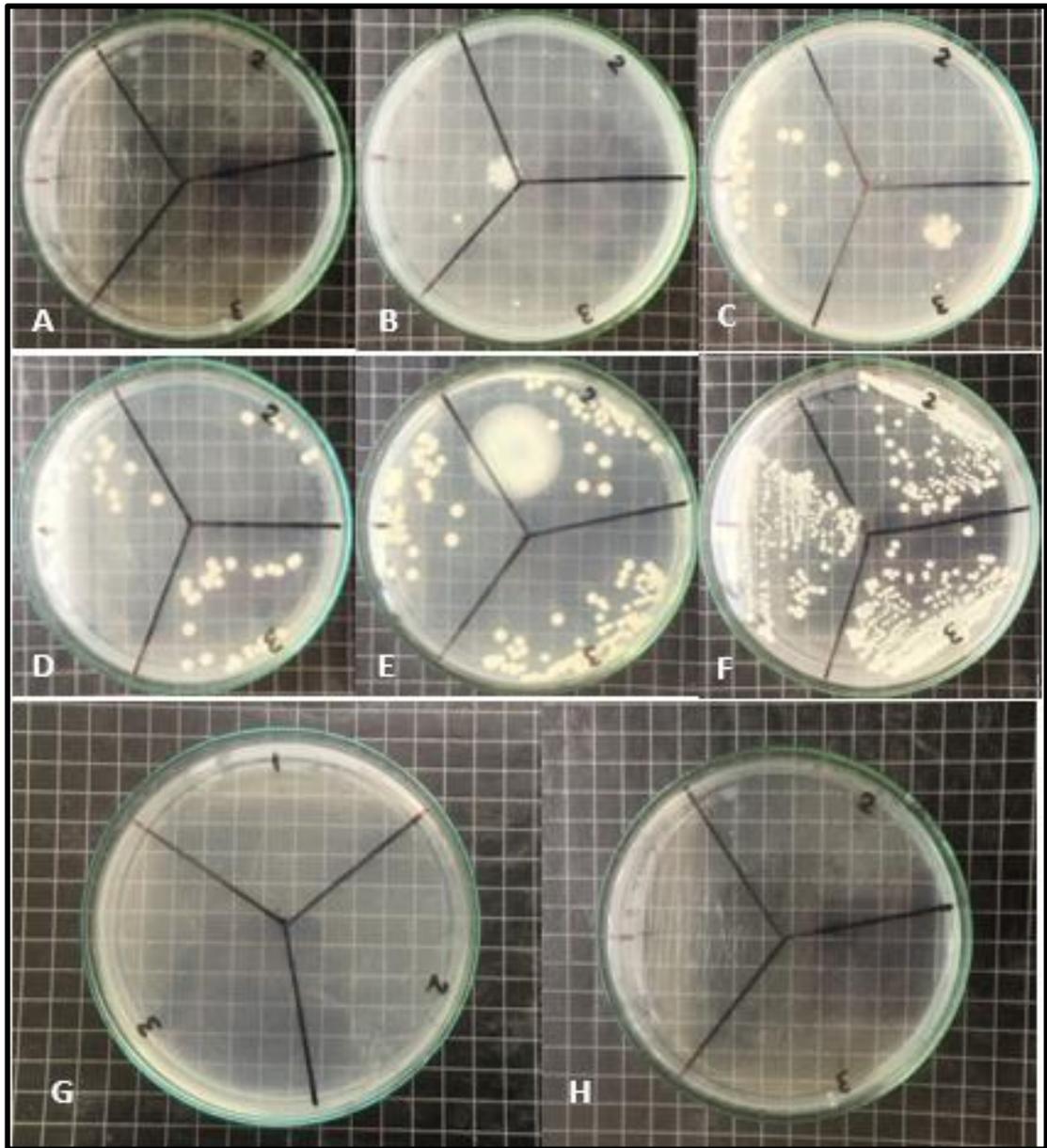


Fig 7. CMB (Concentración mínima bactericida) en *C. albicans*. **A:** Concentración 1 (). **B:** Concentración 2 (). **C:** Concentración 3 (). **D:** Concentración 4 (). **E:** Concentración 5 (). **F:** Control (+). **G:** Control (-). **H:** Tween 80 (Fuente: Elaboración propia)

9. Sensibilidad microbiana:

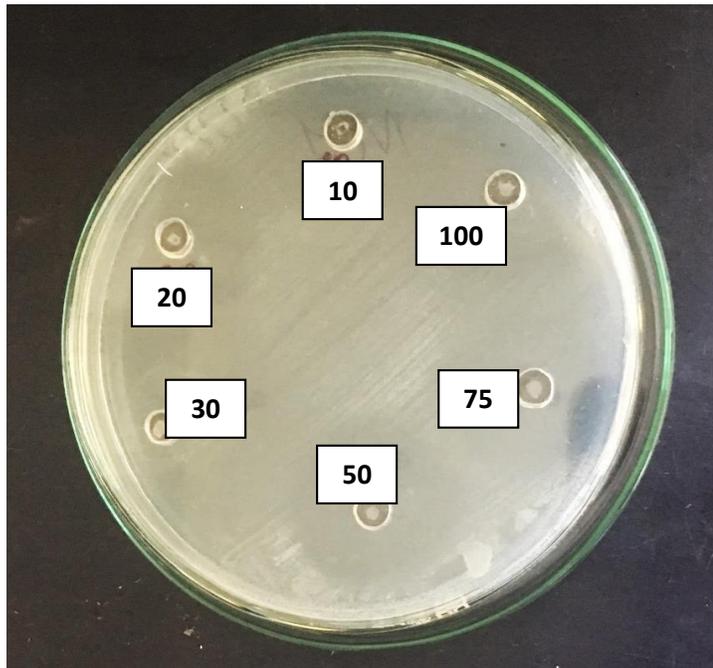


Fig 8. Diámetro de halos de inhibición en *Streptococcus mutans*. (Fuente: Elaboración propia)

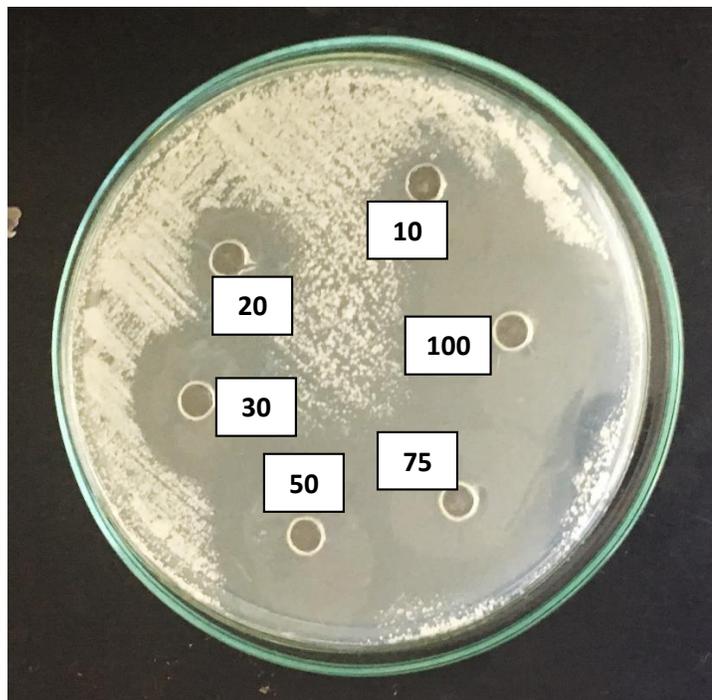


Fig 9. Diámetros de halos de inhibición en *Candida albicans*. (Fuente: Elaboración propia)

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición en *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*, según el volumen del aceite esencial de *Schinus molle* L. (Fuente: Elaboración propia)

VOLUMEN DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Schinus molle</i> L.	DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN					
	<i>Streptococcus mutans</i>			<i>Candida albicans</i>		
	REPETICIONES			REPETICIONES		
	1	2	3	1	2	3
10 µL	20 mm	12 mm	15 mm	10 mm	12 mm	13 mm
20 µL	22 mm	15 mm	17 mm	15 mm	13 mm	17 mm
30 µL	24 mm	17 mm	20 mm	24 mm	15 mm	24 mm
50 µL	24 mm	20 mm	23 mm	30 mm	20 mm	30 mm
75 µL	25 mm	25 mm	26 mm	32 mm	24 mm	31 mm
100 µL	29 mm	30 mm	31 mm	35 mm	30 mm	33 mm

GRÁFICO N° 1: Sensibilidad de *Streptococcus mutans*. (Fuente: Elaboración propia)

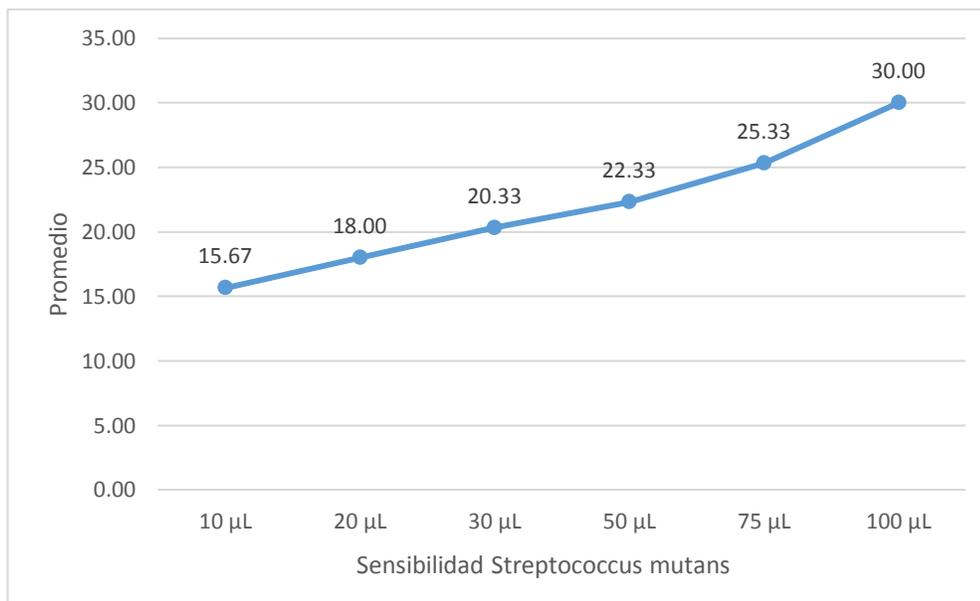
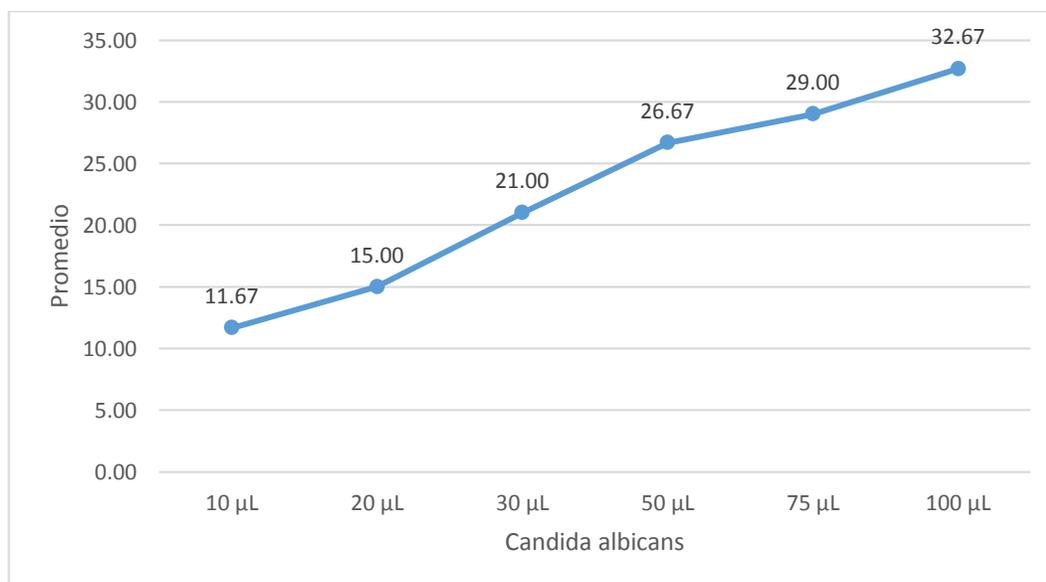


GRÁFICO N°2: Sensibilidad de *Candida albicans*. (Fuente: Elaboración propia)



10. *Streptococcus mutans* (membrana):



Fig 10. *Streptococcus mutans* coloreado con tinción Gram, en esta imagen se aprecia algunas agrupaciones de bacterias rodeadas por lo que aparentemente sería una capa o membrana (Fuente: Elaboración propia).