



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**E. A. P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**



**TESIS**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS  
ACUOSOS Y ACEITES ESENCIALES DE *Salvia macrophylla* L. (SALVIA)  
Y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (LLOQUE) SOBRE *Streptococcus mutans***

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**BACH. CELMIRA MEDALITH VIGO LEZMA**

**ASESORA:**

Dra. Mblga. CLAUDIA CAROLINA RODRÍGUEZ ULLOA

**CO-ASESORA:**

Dra. Q.F. JÉSSICA NATHALIE BARDALES VALDIVIA

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2022**

Copyright ©  
**VIGO LEZMA CELMIRA MEDALITH**  
Todos los derechos reservados

## FICHA CATALOGRÁFICA

Celmira V. 2022. **Efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (Salvia) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (Lloque) sobre *Streptococcus mutans*** / Vigo Lezma Celmira Medalth.

Asesor: Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –  
UNC 2022

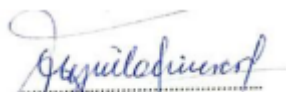
**Efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (Salvia) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (Lloque) sobre *Streptococcus mutans*.**

Autor: Bach. Vigo Lezma Celmira Medalith.

Asesor: Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del título profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca por los siguientes jurados:

### **JURADO EVALUADOR**



**PRESIDENTE**

**M.Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos**



**Secretario**

**Deza Arroyo Nilton Eduardo**



**Vocal**

**López Orbegoso John Victor**

Anexo 2

Universidad Nacional de Cajamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUAL, BASADA EN EL REGLAMENTO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS VIRTUALES. RESOLUCIÓN 944-2020 artículo 8

Siendo las 17:20 horas del día 23 de marzo de 2022, se procedió a iniciar la sustentación virtual de la tesis titulada: Efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (Salvia) y *Kogonechia lanceolata* R. (Lloque) sobre *Streptococcus mutans*, presentado por la Bachiller en Ciencias Biológicas: CELMIRA MEDALITH VIGO LEZMA.

El Jurado Evaluador está integrado por:

Presidente: M.Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos

Secretario: Dr. Nilton Eduardo Deza Arroyo

Vocal: M. Cs. John Victor López Orbegoso

Asesora: Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co. Asesora: Dra. Jéssica Nathalie Baudales Valdívía

Terminado el tiempo de sustentación estipulado en el Reglamento, la tesista ha obtenido el siguiente calificativo: DIECISIETE (17).

Siendo las 18:40 del día 23 de marzo de 2022, se dio por concluido el proceso de Sustentación Virtual de la Tesis



Presidente  
Orejuela Chirinos Rodolfo Raúl



Secretario  
Deza Arroyo Nilton Eduardo



Vocal  
López Orbegoso John Victor



Asesora  
Rodríguez Ulloa Claudia Carolina



Co. Asesora  
Baudales Valdívía Jéssica Nathalie



Tesista  
Vigo Lezma Celmira Medalith

**A:**

Mis padres y hermanas, que han sido la guía para poder concluir esta etapa en mi desarrollo profesional, con su ejemplo, dedicación y palabras de aliento brindándome su apoyo hasta en las situaciones más complicadas. Sus infinitas virtudes y gran corazón me hacen admirarlos cada día más

## **Agradecimiento:**

Agradezco a Dios por otorgarme la vida, salud y por darme a la familia que tengo.

Agradezco a la Universidad Nacional de Cajamarca por haberme permitido ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que me brindaron sus conocimientos y apoyo para seguir adelante día a día.

Mi agradecimiento también va dirigido a mis queridas asesoras la Dra. Mblgo. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa y la Dra. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento durante el desarrollo de mi tesis.

Y para finalizar, un agradecimiento especial para el Dr. Mblgo. Marco A. Rivera Jacinto por el conocimiento científico brindado y por la paciencia al guiarme durante el desarrollo del proyecto de tesis.

## Tabla de contenido

Titulo.....	viii
Resumen .....	xiv
Abstract .....	xv
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO II.....	4
MARCO TEÓRICO .....	4
2.1. Antecedentes de la Investigación .....	4
2.2. Bases Teóricas .....	7
2.2.1. Caries dental .....	7
2.2.2. <i>Streptococcus mutans</i> .....	9
2.2.3. Factores de virulencia: .....	10
2.2.4. Producción de biofilms: .....	11
2.2.5. Mecanismos moleculares ligados a la virulencia de <i>S. mutans</i> : .....	12
2.2.6. Características y propiedades de las plantas medicinales: .....	12
2.3. Definición de términos: .....	16
CAPITULO III: .....	18
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	18
3.1. Nivel de Investigación: .....	18
3.2. Tipo y diseño de estudio .....	18
3.3. Material biológico: .....	18
3.4. Área de Estudio o Lugar de muestreo .....	18
3.5. Toma de muestras .....	19
3.5.1. Muestras de pacientes con caries dentales .....	19
3.5.2. Muestras vegetales:.....	19
3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos .....	19
3.6.1. Reactivación de cepa de referencia <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175: .....	19
3.6.2. Aislamiento e identificación de <i>S. mutans</i> (23): .....	19
3.6.3. Obtención de extractos y aceites esenciales a partir de <i>S. macrophylla</i> L. (salvia) y <i>K. lanceolata</i> Ruiz (Iloque) (23): .....	20



3.6.4. Evaluación de efecto antibacteriano: Método de difusión en agar con Disco.....	22
3.7. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos.....	24
3.8. Aspectos éticos de la investigación .....	24
CAPÍTULO IV .....	25
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
4.1. Resultados.....	25
4.1.1. Evaluación del efecto antibacteriano.....	25
4.2. Discusión.....	29
CAPÍTULO V .....	33
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	33
5.1. Conclusiones .....	33
5.2. Recomendaciones .....	34
LISTA DE REFERENCIAS .....	35
APÉNDICES .....	39
Apéndice N° 1. Material utilizado para toma de muestra de pacientes con caries dental	39
Apéndice N° 2. Lugar de recolección del material vegetal.....	40
Apéndice N° 3. Especies vegetales. ....	41
Apéndice N° 4. Reactivación de cepa de referencia de <i>S. mutans</i> ATCC® 25175™ .....	42
Apéndice N° 5. Aislamiento de <i>S. mutans</i> .....	43
Apéndice N° 6. Identificación de aislamientos y cepa de referencia de <i>S. mutans</i> ATCC® 25175™ .....	44
Apéndice N° 7. Obtención de aceites esenciales a partir de <i>S. macrophylla</i> L. (salvia) y <i>K. lanceolata</i> Ruiz. (Iloque).....	46
Apéndice N° 8. Obtención de extractos acuosos a partir de <i>S. macrophylla</i> L. (salvia) y <i>K. lanceolata</i> Ruiz. (Iloque).....	48
Apéndice N° 9. Evaluación de efecto antibacteriano: método de difusión en agar con disco. ....	50
Apéndice N° 10. Distribución de los discos para la evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial.....	51
Apéndice N° 11. Distribución de los discos para la evaluación de efecto antibacteriano de los extractos acuosos .....	52

Apéndice N° 12. Identificación bioquímica de estreptococos utilizando el sistema STREPTO SYSTEM 12R.....	53
Apéndice N° 13. Aislamiento e identificación de cepas aisladas de <i>S. mutans</i> ....	54
Apéndice N° 14. Obtención de aceites esenciales y extractos acuosos a partir de <i>S. macrophylla</i> L. (salvia) Y <i>K. lanceolata</i> Ruiz. (lloque) .....	56
Apéndice N° 15. Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de salvia. ....	57
Apéndice N° 16. Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos acuosos. .	59
Apéndice N° 17. Consentimiento para participar en un estudio de investigación. .	60
ANEXOS .....	62
Anexo N°1. Sistema de identificación STREPTO SYSTEM 12R.....	62
Anexo N°2: Documento de aprobación por parte del Comité de Ética.....	68

## **Lista de abreviaciones**

**A.E.:** Aceite esencial

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BHI:** Brain Heart Infusion

**E.A.:** Extracto Acuoso

**GFTs:** Glycosyltransferases

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences

**GC-FID:** Cromatografía de Gases con Detector de Ionización

**GC-MS:** Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

**MTT:** 5-diphenyltetrazolium bromide

## **Glosario**

### **Aceite esencial**

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (22).

### **Extracto acuoso**

Los extractos acuosos son extractos líquidos cuyo solvente es el agua, son menos concentrados que los extractos hidroalcohólicos, con la ventaja de no presentar sedimento y su color y aroma son más suaves (22).

### **Metabolito secundario**

Se llaman metabolitos secundarios a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios (20).

### **Clorhexidina**

Clorhexidina es un antimicrobiano catiónico de amplio espectro. Su acción está dada por la reducción de la formación de la película adquirida y la adhesión microbiana a la superficie dental; por lo tanto, previene la transmisión de microorganismos cariogénicos (15).

**EFFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS  
ACUOSOS Y ACEITES ESENCIALES DE *Salvia macrophylla* L.  
(SALVIA) Y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (LLOQUE) SOBRE *Streptococcus  
mutans***

## Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de los aceites esenciales y extractos vegetales de *Salvia macrophylla* L. (Salvia) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (Lloque) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Se aislaron cepas de dicha especie a partir de muestras de pacientes con caries dental en medio BHI, se obtuvo aceite esencial de salvia mediante destilación por arrastre de vapor, pero no aceite esencial de lloque; los extractos de salvia y de lloque fueron obtenidos mediante extracción acuosa. Se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos acuosos y aceites esenciales sobre los aislamientos de los pacientes y en una cepa de referencia *S. mutans* ATCC® 25175™ por el método de difusión en agar con disco. Se encontró que el aceite esencial de salvia a la concentración del 100 % poseía un efecto inhibitorio en las cepas aisladas, observándose halos con un tamaño promedio de 9.5 mm indicando sensibilidad según la escala de Duraffour; y al disminuir la concentración al 50 % y 25 %, el efecto inhibitorio se vio reducido sobre los aislamientos de *S. mutans*. Los extractos acuosos no mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento. Se concluye que el aceite esencial de salvia a la concentración del 100 % presenta un notable efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento de *S. mutans*, mientras que los extractos acuosos de salvia y de lloque no presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de esta bacteria.

**Palabras clave:** Aceite esencial, extracto Acuoso, caries dental, *Streptococcus mutans*, *Salvia macrophylla*, *Kageneckia lanceolata*, efecto antibacteriano.

## **Abstract**

In this work, the in vitro effect of essential oils and plant extracts of *Salvia macrophylla* L. (Salvia) and *Kageneckia lanceolata* Ruiz (Lloque) on the growth of *Streptococcus mutans* was evaluated on the growth of *S. mutans*. Strains of this species were isolated from samples of patients with dental caries in BHI medium, essential oil of salvia was obtained by steam distillation, but not essential oil of Lloque; the extracts of Salvia and Lloque were obtained by aqueous extraction. The inhibitory effect of aqueous extracts and essential oils on patient isolates and on a reference strain *S. mutans* ATCC® 25175™ was evaluated by the disc agar diffusion method. It was found that sage essential oil at 100 % concentration possessed an inhibitory effect on the isolates, observing halos with an average size of 9.5 mm indicating sensitivity according to the Duraffourd scale; and by decreasing the concentration to 50 % and 25 %, the inhibitory effect was reduced on *S. mutans* isolates. The aqueous extracts showed no inhibitory effect on the growth. It is concluded that the essential oil of Salvia at 100 % concentration presents a remarkable inhibitory effect in vitro on the growth of *S. mutans*, while the aqueous extracts of Salvia and lloque did not present inhibitory effect on the growth of this bacterium.

**Keywords:** Essential oil, Aqueous extract, Tooth decay, *Streptococcus mutans*, *Salvia macrophylla*, *Kageneckia lanceolata*, inhibitory effect.

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa, crónica, transmisible y de origen multifactorial. Tiene una prevalencia entre el 60 % y el 90 % en la población infantil y adolescentes, siendo la principal causa de la pérdida de los dientes en la población, por lo que se considera un problema de salud pública en diferentes países. Entre los factores de riesgo que desencadenan esta enfermedad se puede mencionar el consumo de alcohol, la mala nutrición, el consumo excesivo de azúcares e higiene bucodental deficientes; lo que provoca la acumulación de sarro dental y presencia de placa bacteriana en las encías (1). Varios microorganismos están enmarcados dentro del proceso patológico de la caries dental entre los que podemos encontrar a bacterias de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Actinomyces*, éstas producen inflamación, enrojecimiento y piorrea a nivel de las encías (2).

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en el estudio de la actividad antibacteriana de metabolitos secundarios de las plantas contra diversas patologías incluyendo la caries oral humana, periodontitis y lesiones endodónticas. A pesar de las estrategias modernas basadas en el diseño racional de drogas, las sustancias aisladas de las plantas siguen siendo una fuente importante de productos farmacéuticos debido a que disminuyen las posibilidades de enfrentar efectos secundarios relacionados con el uso de fármacos convencionales (3). En este sentido el efecto antibacteriano de algunas especies vegetales contra *Streptococcus mutans* (bacteria cariogénica) se ha estudiado ampliamente y algunos de sus componentes han sido probados en formulaciones de enjuagues bucales, pasta dental o geles, observando que los aceites esenciales de estas especies vegetales en



altas concentraciones mostraron una reducción de *S. mutans* en la saliva; sin embargo no son del todo efectivas para mantener la higiene oral y prevenir la placa dental, en comparación con formulaciones de higiene oral de venta libre (4).

En la búsqueda de nuevos agentes anticariogénicos de origen natural podemos encontrar a *Salvia macrophylla* L. (salvia) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (lloque). Un estudio reciente del género *Salvia* ha revelado una amplia gama de actividades farmacológicas como efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, antioxidantes, antimicrobianos, antidemenciales, hipoglucémicos (5); mientras que *K. lanceolata* Ruiz utilizada en la medicina tradicional, también ha mostrado actividad antibacteriana; por consiguiente, conocer su eficacia antibacteriana puede ser de utilidad para sintetizar productos anticariogénicos y generar formulaciones más eficaces (6).

Por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto in vitro de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (salvia) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz (lloque) sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Para lo cual, se obtuvieron aceites esenciales y extractos acuosos a partir de muestras de material vegetal recolectado en la región de Cajamarca, provincia de San Marcos, distrito de Pedro Gálvez. Por otro lado, las muestras microbiológicas se obtuvieron mediante hisopado dental de pacientes con caries de la clínica dental “Smile Center” para posteriormente aislar microorganismos cariogénicos particularmente *S. mutans*. El efecto inhibitorio se evaluó en las cepas aisladas y en una cepa de referencia *S. mutans* ATCC® 25175™ por el método de difusión en agar con disco siguiendo las pautas establecidas por Duraffourd, para estudios microbiológicos, posteriormente los datos obtenidos se evaluaron haciendo uso de las medidas de tendencia central (media aritmética, media geométrica) y de dispersión (desviación estándar); además, se corroboró su normalidad usando el Test de Shapiro

Wilk. Para comparar los efectos bactericidas entre las muestras problemas y controles se realizó la prueba Kruskal Wallis. El nivel de significación estadística fue  $p < 0,05$ .

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la Investigación

En el año 2013 se realizó un estudio de corte longitudinal para evaluar la diversidad, la similitud y la estabilidad de los genotipos de *Streptococcus mutans* asociados con la historia de caries dental. A 67 niños de 5 y 6 años, considerados de alto riesgo de caries, se les extrajo placa desde el inicio hasta los 36 meses para el aislamiento de *S. mutans* y el genotipado con PCR palindrómica extragénica repetitiva (4392 aislamientos en total). Las superficies deterioradas, faltantes y rellenas (dmfs / DMFS) de cada niño se registraron al inicio del estudio. Se encontraron 18 genotipos distintos entre 911 aislamientos de 67 niños (diversidad) y 13 genotipos fueron compartidos por al menos 2 niños (concordancia). El número de genotipos por individuo se asoció positivamente con la proporción de superficies deterioradas (p-ds) al inicio del estudio. Veinticuatro de los 39 niños que estuvieron disponibles en las visitas de seguimiento mantuvieron un genotipo predominante durante los períodos de seguimiento (estabilidad) y se asoció negativamente con p-ds. La diversidad, la similitud y la estabilidad observadas de los genotipos de *S. mutans* representan un patrón de epidemiología de la caries dental en esta comunidad de alto riesgo de caries, lo que sugiere que menos superficies deterioradas se asocian significativamente con una menor diversidad y estabilidad de los genotipos de *S. mutans* (7).

Aguilar en el año 2018, en la búsqueda de nuevas plantas que tengan efecto sobre bacterias cariogénicas como *Streptococcus mutans*, estudió cinco plantas alto andinas: *Cymbopogon citratus*, *Piper elongatum*, *Minthostachys setosa*, *Schinus molle* y *Luma chequen*, de las cuales los aceites esenciales de *C. citratus* y *P. elongatum* al ser empleados en bajas

concentraciones inhibieron el crecimiento de *S. mutans*, por lo que podrían emplearse como agentes anticariogénicos en productos de higiene oral (4).

Existen muchos estudios relacionados con *Salvia* spp en diversos ámbitos desde aplicaciones alimentarias como es el caso de la investigación realizada por Sharifi-Rad en 2018 (8), hasta su uso farmacológico en el cual Hayouni en 2002, demostró la actividad antimicrobiana de *Salvia officinalis* L. y las bayas de *S. molle* L. contra el género *Salmonella* (9).

En el año 2016 se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica obteniendo que las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/mL causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Aunque no causaron el mismo efecto sobre *Escherichia coli* y *Candida tropicalis*, esto podría indicar que *S. apiana* presenta un espectro muy específico de actividad antimicrobiana (10).

Padilla en el año 2016 (11), evaluó un tipo de lamiácea, llegando incluso a formular un enjuague bucal a partir de los extractos etanólicos totales individualizados y de la mezcla de *Matricaria recutita* L. (manzanilla) y de *Salvia officinalis* L. (salvia). Se valoró siete concentraciones de cada extracto (100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000 y 10000 ppm); presentando así la salvia actividad antibacteriana para las dos cepas de bacterias ensayadas (*S. mutans* y *S. aureus* causantes de enfermedades bucales); a diferencia de la manzanilla que no presentó inhibición bacteriana, pero la mezcla de estos dos extractos presentó alta eficiencia.

En el 2018 se realizaron estudios etnofarmacológicos, composición química, actividades antibacterianas y citotóxicas de aceites esenciales de 11 especies de salvia en Irán, estas fueron analizadas por GC-FID y GC-MS en donde se identificaron 58 compuestos, siendo  $\alpha$ - y  $\beta$ - pineno, 1,8-cineol,  $\beta$ - cariofileno y esclareol los constituyentes principales. Además, se evaluó la actividad citotóxica de los aceites esenciales (AE) frente a tres líneas de células cancerosas humanas (HT-29, MCF-7 y MOLT-4) utilizando un ensayo de reducción de MTT. Los aceites mostraron actividades citotóxicas débiles a moderadas. Las actividades antibacterianas de los aceites se ensayaron en tres bacterias Gram positivas y cuatro Gram negativas por métodos de microdilución y difusión en agar con disco. Las actividades antibacterianas de los aceites se compararon con las informadas anteriormente para algunas de las especies de salvia. Entre las bacterias analizadas, *Bacillus subtilis* y *Salmonella typhi* fueron los organismos más susceptibles con CMI de 0,312 y 2,5 mg / mL de medio frente a todos los AE analizados. Los autores revisaron la información etnofarmacológica publicada sobre las especies de salvia del mundo y la compararon con los datos de esas especies que se utilizaron en la medicina popular iraní. Entre las salvias iraníes, *S. mirzayanii* y *S. hydrangea* son utilizadas por los habitantes de las ciudades del suroeste de Irán como plantas medicinales. Las partes aéreas de *S. mirzayanii* se utilizan para el tratamiento de la diabetes, dolor de estómago, infecciones, enfermedades inflamatorias, espasmos, trastornos gastrointestinales y como medicina astringente - antiséptica. Mientras que las flores de *S. hydrangea* tienen efectos antiinflamatorios, espasmolíticos, diuréticos, sedantes y carminativos y también se utilizan para tratar la tos, el dolor de garganta y la fiebre (12).

En relación con la especie vegetal *Kageneckia lanceolata* (lloque), no hay muchos estudios realizados, aunque Churata en el año 2016 evaluó el efecto antipirético y antiinflamatorio del extracto de hojas de esta planta en animales de experimentación (ratas especie *Rattus*

*Rattus*, raza Holtzman), demostrando que sólo presenta actividad antipirética con moderada intensidad (13).

Otros estudios como el de Delporte en el año 2002 (14), investigaron propiedades medicinales de la familia *Rosaceae*, en el cual se investigaron las probables propiedades antipiréticas, antiinflamatorias, analgésicas y antioxidantes de *K. oblonga*, se aislaron los principales compuestos de sus extractos activos. El estudio comprendió la toxicidad aguda de los extractos de metanol, hexano, diclorometano y metanol globales. Se estudió la citotoxicidad del extracto de metanol global en tres líneas de células tumorales. Todos los extractos exhibieron las actividades farmacológicas en estudio, siendo el metanol y el diclorometano los extractos más tóxicos. La citotoxicidad de ambas cucurbitacinas en neutrófilos humanos a las concentraciones ensayadas no fue estadísticamente significativa. Los ensayos in vitro mostraron que ambas cucurbitacinas pueden ser parcialmente responsables de las actividades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias.

## **2.2. Bases Teóricas**

### **2.2.1. Caries dental**

La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial, que se produce principalmente por tres factores: el huésped (higiene bucal, la saliva y los dientes), la microbiota (infecciones bacterianas) y el sustrato (dieta cariogénica). Además de estos factores, debe tenerse en cuenta el tiempo. Para que se forme una caries es necesario que las condiciones de cada factor sean favorables; es decir, un huésped susceptible, una microbiota oral cariogénica y un sustrato apropiado que deberá estar presente durante un período determinado de tiempo (15).

Con respecto al huésped, es necesario analizar las propiedades de la saliva y la resistencia del diente a la acción bacteriana. La saliva es una solución supersaturada en calcio y fosfato, previene la desmineralización del esmalte, tienen un importante papel en la remineralización y son esenciales en el balance ácido-base de la placa. Las macromoléculas salivales están comprometidas con la formación de la película adquirida. Así también se han aislado en la saliva, péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana (15).

El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial de la bacteria a la superficie del diente. Entre las bacterias asociadas con la caries tanto en animales de experimentación como en humanos, se tiene al género *streptococcus* (*S. mutans* y *S. mitis*), así como a *Rothia dentocariosa* (16). La adhesión inicial está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva que son adsorbidas por el esmalte dental. Para la colonización bacteriana, es imprescindible la formación previa de una fina película de proteínas salivales sobre la superficie del diente. La interacción se produce en cierta medida a través de cargas electrostáticas. La carga eléctrica de las proteínas se relaciona con la presencia de grupos ionizables en sus aminoácidos constituyentes (17).

Estudios recientes indican que la unión de las bacterias a la película adquirida y entre sí, no puede ser explicada solamente por uniones electrostáticas, sino que se ha evidenciado la acción de moléculas de naturaleza proteica en la superficie de las bacterias, denominadas adhesinas, que se unen a las proteínas salivales las cuales actúan como receptores y facilitan la adherencia bacteriana. Esto es posible por el fenómeno de reconocimiento molecular. Se ha observado que mientras mayor es la capacidad de adherencia del microorganismo, mayor la posibilidad de caries dental (15).

Otro de los factores que favorecen el desarrollo de la caries dental es el sustrato cariogénico, producido por el consumo excesivo de azúcares simples. Los azúcares consumidos con la dieta constituyen el sustrato de la microbiota bucal y dan inicio al proceso de cariogénesis. Numerosos estudios han demostrado la asociación entre caries y carbohidratos refinados o azúcares, especialmente, la sacarosa o azúcar común. (15).

La sacarosa, formada por dos monosacáridos simples: la fructosa y la glucosa; se considera como el carbohidrato más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino porque *S. mutans* lo utiliza para producir glucano, polisacárido extracelular, que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, inhibiendo las propiedades de difusión de la placa (18).

### **2.2.2. *Streptococcus mutans***

*S. 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 amoniaco. 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. *S. mutans* se ha subclasificado en varios tipos con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *S. mutans* son *c*, *e*, *f* y *k* (19), siendo el serotipo *c* el tipo más común en la cavidad oral con una prevalencia de aproximadamente el 70-80 %, seguido del serotipo *e* (aproximadamente el 20 %). Por el contrario, las frecuencias de distribución de los serotipos *f* y *k* en la cavidad bucal son bastante bajas, con una prevalencia inferior al 5%. *S. mutans* se considera un



patógeno importante de la caries dental, especialmente en lo que respecta al inicio de la enfermedad (20).

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 (19).

### 2.2.3. Factores de virulencia

- **Acidogenicidad:** el estreptococo puede fermentar los azúcares de la dieta para producir principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental.
- **Aciduricidad:** es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
- **Acidofilicidad:** el estreptococo puede resistir la acidez del medio bombeando protones ( $H^+$ ) fuera de la célula.
- **Síntesis de glucanos y fructanos:** por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano, a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.

- **Síntesis de polisacáridos intracelulares**, como el glucógeno: sirven como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos períodos aún en ausencia de consumo de azúcar.
- **Producción de dextranasa**: además de movilizar reservas de energía, esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano (17).

#### **2.2.4. Producción de biofilms**

Uno de los factores más importantes dentro de la virulencia de *S. mutans* es la producción de biofilms (biopelículas) en la superficie de los dientes. Aunque las biopelículas dentales son complejas y consisten en diversas comunidades microbianas, este microorganismo ha sido considerado el principal patógeno en el inicio y desarrollo de la caries dental, especialmente en la caries de la primera infancia. *S. mutans* posee varios factores de virulencia, uno de los cuales es el mecanismo de adhesión dependiente de la sacarosa responsable de colonización de la superficie dentaria. Este modo de adhesión contribuye significativamente a la formación de biopelículas cariogénicas y carcinogenicidad. Por otro lado la producción de exopolisacáridos (EPS) es un factor crucial para la formación de biofilms, el EPS en las biopelículas proporciona a los microorganismos un microambiente único para su crecimiento, metabolismo y supervivencia, y permite que los microorganismos se vuelvan más resistentes a las condiciones ambientales duras y desafiantes, la inmunidad del huésped y las terapias antimicrobianas tradicionales, así como también previene la disociación y mejora su estabilidad mecánica (21).

### **2.2.5. Mecanismos moleculares ligados a la virulencia de *S. mutans***

Entre los mecanismos moleculares responsables de la virulencia de esta bacteria podemos encontrar que la adhesión dependiente de sacarosa está mediada por las actividades de las glucosiltransferasas (Gtfs), una familia de enzimas que pueden dividir la sacarosa, el único sustrato de Gtfs, en glucosa y fructosa, y une el resto de glucosa a través de enlaces glicosídicos para formar un polímero de glucano en crecimiento (EPS). Más importante aún, se ha demostrado recientemente que las interacciones entre *S. mutans* y ciertos miembros de la comunidad de placa dental a través de Gtfs ejercen una influencia importante en el desarrollo y patogenicidad de la placa dental. Por ejemplo, *Veillonella parvula*, una bacteria oral que prefiere consumir ácido láctico como fuente de carbono, altera los factores de virulencia de *S. mutans* aumentando las expresiones de Gtfs en un modelo de biofilm de dos especies, lo que sugiere que está involucrada en el desarrollo de *S. mutans*. Además de las bacterias, los hongos pueden mejorar la patogenicidad de *S. mutans* a través de su impacto en las expresiones de *S. mutans* Gtfs (21).

### **2.2.6. Características y propiedades de las plantas medicinales**

#### **a. Salvia**

**Nombres comunes:** Chochocón, salvia (22).

**Nombre científico:** *Salvia macrophylla* L (22).

#### **Taxonomía**

**Orden:** Lamiales

**Familia:** *Lamiaceae*

**Género:** *Salvia*

**Especie:** *Salvia macrophylla*

### **Descripción botánica**

Se forma un arbusto grande que alcanza el metro y medio de alto y ancho con hojas gruesas, de color amarillo verdoso, en forma de deltoides. Muy marcadas y llamativas, las espigas de la flor de genciana azul verdadero ocurren desde el verano hasta el otoño (22).

### **Distribución**

Herbácea perenne de los Andes (Ecuador, Perú y Chile) en elevaciones de hasta 3200 m s. n. m. (22).

### **Composición química**

Flavonoides, esteroides, alcaloides, taninos, cardenólidos, compuestos fenólicos, derivados del Catecol, aceites esenciales ( $\alpha$  y  $\beta$ -tuyonas (3560%),  $\alpha$ -terpineol (0,1-9%), linalol (0,5-12%), oxido de cariofileno (1-10%), 1,8-cineol (8-23%), d-terpineol,  $\alpha$ -pineno (1-6,5%), mirceno, canfeno (1,57%), limoneno (0,5-3%), ocimeno, alo-ocimeno, p-canfeno, pradendreno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno (0-12%),  $\alpha$ -maalieno,  $\alpha$ -corocaleno,  $\beta$ -copaeno, isovaleriano de metilo, alcanfor (4,5-24;5%), timol, acetato de bornilo (2,5% como máximo), acetato de sabinol y acetato de linalol (1% como máximo) (22).

### **Usos medicinales**

Su buena cantidad de compuestos fenólicos y taninos le otorga efectos antisépticos y antibacterianos para evitar complicaciones de resfríos. También sirve para hacer gárgaras. La presencia de flavonoides y alcaloides permiten asimismo una acción antibacteriana y antiinflamatoria en procesos gripales. Además, fortalece la actividad del corazón (22).

### **Actividad antimicrobiana**

Se ha reportado actividad inhibitoria *in vitro* del aceite esencial frente a gérmenes Gram negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella ozanae*, *Shigella sonnei* y *Salmonella spp.*), Gram positivos (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*) y hongos (*Torulopsis glabrata* y *Cryptococcus neoformans*). En cambio, no se reportó actividad inhibitoria del aceite esencial frente a *Pseudomonas aureginosa* ni sobre *Staphylococcus aureus* (11).

La actividad antimicrobiana estaría dada fundamentalmente por el contenido de tuyonas del aceite esencial y en menor medida por otros componentes como ser peneol, alcanfor, 1,8-cineol, borneol, cariofilenoy su principio amargo picrosalvina. Nuevas investigaciones dan cuenta de la importancia del ácido rosmarínico en la actividad antimicrobiana. Por otra parte, el extracto acuoso de las hojas demostró actividad antiherpética (HVS-2) con inhibición del efecto citopático en cultivo de células HeLa (11).

### **b. Lloque**

**Nombres comunes:** Lloque, sacha durazno, durazno de la sierra (22).

**Nombre científico:** *Kageneckia lanceolata* Ruiz

### **Descripción botánica**

Arbusto perenne de ramas alargadas, ramificado desde la base, de 2-5 m de alto, cuyo tronco oscila entre los 10 – 20 cm de diámetro, con ramas floríferas inermes algo resinosas en el borde. Hojas coriáceas, lanceoladas u oblanceoladas, largamente cuneadas hasta la base, redondeada o cortamente agudas en el ápice, 3-5 cm de longitud y 1 cm de ancho, finamente glandular serrulada desde el ápice hasta la base. Flores de 2 cm de ancho, corimboso con pocos pedicelos. Corola de color blancocremoso, 5 pétalos. Fruto de 3cm

de diámetro, endurecido, pubescente, con 5 folículos, cada uno de 1,2-2,0 mm longitud. Semillas de 10-12 mm de longitud (22).

### **Distribución**

Arbusto perenne que crece en laderas de cerros con pendientes rocosas en suelos pedregosos, franco-arenosos formando algunas veces comunidades. Se le encuentra desde los 2800-3700 msnm (22).

### **Taxonomía (22)**

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Subclase:** Rosidae

**Orden:** Rosales

**Familia:** *Rosaceae*

**Género:** *Kageneckia*

**Especie:** *Kageneckia lanceolata*

### **Composición química**

Se reportó la presencia de taninos, terpenos, flavonoides (13).

### **Usos medicinales**

El cocimiento de la corteza y las hojas se utilizan como antipalúdicos y febrífugos. Para el dolor de pecho se utiliza el cocimiento del fruto. En dolor de dientes se recomienda masticar el fruto. Para el dolor de estómago tomar la infusión. En caso de estreñimiento tomar el mate de tres frutos. En amigdalitis se recomienda hacer gárgaras con el cocimiento del fruto. También se le atribuyen propiedades antidiarreicas y analgésicas (22).

### **2.3. Definición de términos**

- **Aceite esencial**

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica. Los aceites esenciales atacan las paredes celulares de ciertas bacterias, haciendo que éstas sean más permeables, facilitando la entrada del ácido benzoico, que atraviesa la pared celular y alterando su fisiología por reducción del pH en el interior de la célula, lo que provoca problemas metabólicos importantes que impiden la multiplicación bacteriana en unos casos, o la muerte de la bacteria (22).

- **Extracto acuoso**

Los extractos acuosos son extractos líquidos cuyo solvente es el agua, son menos concentrados que los extractos hidroalcohólicos, con la ventaja de no presentar sedimento y su color y aroma son más suaves (22).

- **Metabolito secundario**

Se llaman metabolitos secundarios a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es letal para el organismo, al contrario que los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (20).

- **Terpenos**

Los terpenos son el principal constituyente de los aceites esenciales de algunas plantas y flores. Son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno (o 2metilbuta-1,3-dieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Juegan un rol importante en la medicina tradicional y en los remedios herbolarios, y se están investigando sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos (12).

- **Clorhexidina**

Clorhexidina es un antimicrobiano catiónico de amplio espectro. Su acción está dada por la reducción de la formación de la película adquirida y la adhesión microbiana a la superficie dental; por lo tanto, previene la transmisión de microorganismos cariogénicos (15).



## CAPITULO III

### DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

#### 3.1. Nivel de Investigación

Descriptivo

#### 3.2. Tipo y diseño de estudio

**Tipo de estudio:** Descriptivo

**Diseño de estudio:** Observacional

#### 3.3. Material biológico

- ✓ Aislamientos de *Streptococcus mutans* obtenidos de muestras de pacientes adultos con caries dentales.
- ✓ Cepa de referencia de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- ✓ Hojas de *Salvia macrophylla* L.(salvia)
- ✓ Hojas de *Kageneckia lanceolata* Ruiz (lloque)

#### 3.4. Área de Estudio o Lugar de muestreo

- ✓ La salvia y el lloque fueron colectados en el centro poblado la Huaylla, distrito de Pedro Gálvez, provincia de San Marcos, ubicado a una altitud de 2251 m. s. n. m, latitud de 07°20'10", longitud de 78°10'22" (Apéndice N° 1).
- ✓ *S. mutans* fue aislada de pacientes adultos con caries dentales, que fueron atendidos en el centro odontológico "Smile Center" ubicado en el distrito de Cajamarca (Apéndice N° 2).

### **3.5. Toma de muestras**

#### **3.5.1. Muestras de pacientes con caries dentales**

Las muestras fueron obtenidas, con un hisopo estéril embebido en Brain Heart Infusion (BHI), del diente que presentó caries. Cada una de las muestras fue depositada en un tubo de ensayo con tapa rosca, el mismo que contenía 5mL de BHI estéril; inmediatamente fueron trasladadas, bajo cadena de frío, al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Cajamarca para el aislamiento e identificación de *S. mutans* (Apéndice N° 1).

#### **3.5.2. Muestras vegetales**

Se colectaron aproximadamente 8 kg de hojas de *S. macrophylla* (salvia) y también de *K. lanceolata* (lloque) (Apéndice N° 3), las cuales fueron trasladadas a la Universidad Nacional de Cajamarca para la identificación taxonómica de las plantas, que se realizó en el Laboratorio de Botánica del Departamento de Ciencias Biológicas.

### **3.6. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos**

#### **3.6.1. Reactivación de cepa de referencia *Streptococcus mutans* ATCC 25175**

La cepa de *S. mutans* ATCC 25175 fue sembrada en agar sangre e incubada por 24 - 48 horas a 37 °C (Apéndice N° 4).

Se realizó la comparación de la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 con las bacterias aisladas de pacientes con caries dental para asegurarnos que estas pertenecen a dicha especie (23).

#### **3.6.2. Aislamiento e identificación de *S. mutans* (23)**

Las muestras obtenidas fueron sembradas por estría en las placas con agar sangre (la forma de preparación del medio de cultivo fue pesando 38 g de agar base sangre en 1000 mL de

agua destilada, se esterilizó en autoclave a 121 °C, luego se le adicionó la sangre desfibrinada al 7% con movimientos rotatorios suaves, para evitar la hemólisis). Las placas fueron llevadas a incubar en jarras de anaerobiosis a 37 °C por 48 - 72 horas (Apéndice N° 5).

Se examinaron de 5 a 20 colonias en promedio con características de *S. mutans* (colonias adherentes, blanco grisáceas, con superficie rugosa, apariencia de vidrio esmerilado y consistencia dura, que no pudieron ser disgregadas cuando se manipularon con un asa de platino), además se realizó coloración Gram (donde se observó en un microscopio óptico la morfología ovoide y elongada de las células, dispuestas en pares o cadenas cortas), adicionalmente se realizó la prueba de la catalasa (catalasa negativo) (Apéndice N° 6).

Los aislamientos seleccionados con las características adecuadas fueron sometidas al sistema de identificación de estreptococos STREPTO SYSTEM 12R (Anexo N° 1), el cual permitió la comparación de sus perfiles bioquímicos haciendo uso de 12 pruebas bioquímicas preestablecidas, obteniendo un total de 17 aislamientos de *S. mutans*.

Una vez identificada la bacteria por las características morfológicas y pruebas bioquímicas, se conservó en agar sangre a - 20 °C.

### **3.6.3. Obtención de extractos y aceites esenciales a partir de *S. macrophylla* L.**

**(salvia) y *K. lanceolata* Ruiz (lloque) (23)**

#### **a. Selección de la muestra vegetal**

Después de la recolección de las hojas de salvia y lloque se lavó con agua potable y se seleccionaron las hojas, descartando aquellas deterioradas por agresiones ambientales y por insectos. Luego se trasladó el material al Laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Particular Antenor Orrego para la obtención de aceites esenciales.

## **b. Obtención de aceites esenciales**

A partir de las hojas seleccionadas de las especies vegetales, se procedió a obtener el aceite esencial por el método de arrastre de vapor de agua, se cortó las hojas en pequeños trozos y se pesó 7 kg, luego se colocó en el recipiente para la muestra y se agregó 20 litros de agua en el tanque generador de vapor. Posteriormente se acoplaron los tres componentes del equipo, dejando correr el agua por el refrigerante; se extrajo el aceite esencial por un tiempo de 4 horas, transcurrido el tiempo de extracción, se separó el agua del aceite con la ayuda de una pera de decantación.

Se obtuvo aproximadamente 21 mL de aceite esencial de salvia, representando un porcentaje del 0,3% de rendimiento. El aceite de salvia obtenido presentaba un olor *sui generis*, además tenía apariencia traslúcida con una ligera tonalidad amarilla y una densidad menor a la del agua. Para el lloque se realizó el mismo procedimiento de extracción; sin embargo, no se logró obtener aceite esencial por este método.

Posteriormente el aceite esencial de salvia obtenido fue guardado en frascos de vidrio herméticos, color ámbar, bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C (23) (Apéndice N° 7).

## **c. Obtención de extractos acuosos**

Se pesó 10 gramos de las especies vegetales. En un matraz de Erlenmeyer se agregó 100 ml de agua el cual se llevó a ebullición, se apagó la fuente de calentamiento, posteriormente se vierte la planta y se tapó el recipiente dejándolo en reposo de 3 a 5 minutos; finalmente se procedió a enfriar y filtrar la muestra.

Los extractos de salvia y de lloque obtenidos tenían un color *sui generis*, olor característico y una densidad similar al agua, lo cual indica que el procedimiento de extracción fue el adecuado Posteriormente se guardó las soluciones obtenidas en frascos de vidrios hermético, color ámbar, bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C (Apéndice N° 8).

**d. Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *S.***

***macrophylla* (salvia)**

Para la obtención de diferentes concentraciones (100%, 50%, 25%) de aceite esencial de *S. macrophylla* (salvia) se utilizó alcohol de 96 %.

Se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_I \cdot V_I = C_F \cdot V_F$$

Donde:

**C<sub>I</sub>**: Concentración inicial (%)

**V<sub>I</sub>**: Volumen inicial (mL)

**C<sub>F</sub>**: Concentración final (%)

**V<sub>F</sub>**: Volumen final (mL)

**3.6.4. Evaluación de efecto antibacteriano: Método de difusión en agar con Disco**

De las colonias aisladas de *S. mutans* se procedió a ajustar el inóculo en caldo BHI por comparación visual hasta la turbidez ( $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  UFC/mL) equivalente al tubo N° 0,5 en la escala de Mac Farland.

Se procedió a depositar 100 µL de la suspensión bacteriana sobre el medio agar sangre y se dispersó con la técnica de hisopado en todas las direcciones. Se empleó 80 µL del aceite esencial de salvia al 100 %, 50 % y 25 %, para embeber los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, también fueron embebidos discos con 80 µL de clorhexidina 0,12 % (control

positivo) y alcohol al 96 % (testigo), respectivamente. Con pinzas estériles, se colocaron los discos de papel sobre las placas con la suspensión bacteriana (Apéndice N° 10), posteriormente se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37 °C por 72 horas y finalmente se realizó la lectura de los halos de inhibición utilizando un calibrador vernier. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado (Apéndice N° 9).

Para evaluar el efecto antibacteriano de los extractos acuosos de salvia y de lloque de manera individual y la mezcla sobre el crecimiento de *S. mutans*, se depositó 100 µL de la suspensión bacteriana sobre placas con agar sangre y se dispersó con la técnica de hisopado en todas las direcciones. Se embebió los discos de papel con 80 µL de cada uno de los extractos, también fueron embebidos discos con clorhexidina 0,12 % (control positivo) (Apéndice N° 11). Con pinzas estériles, se colocaron los discos de papel sobre las placas con la suspensión bacteriana (Apéndice N° 11), posteriormente se incubaron en jarras de anaerobiosis a 37 °C por 72 horas y finalmente se realizó la lectura de los halos de inhibición utilizando un calibrador vernier. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Este procedimiento fue realizado tanto para la cepa aislada como para la cepa de referencia *S. mutans* ATCC 25175. Para la interpretación de los resultados en la evaluación de tipo cuantitativa se tomó como referencia los diámetros de halo de inhibición y se tomó como referencia las pautas establecidas por Duraffourd en 1983, utilizadas en estudios microbiológicos (23):

- Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm.
- Sensible (sensible =+) >8 a 14 mm.
- Muy sensible (muy sensible =++) > 14 a 19 mm.
- Sumamente sensible (S.S.= +++) > 19 mm.

### **3.7. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos**

Los datos fueron ingresados y procesados en una base de datos del software estadístico IBM SPSS Statistics versión 23. Para el diámetro de los halos de inhibición se realizó el cálculo de medidas de tendencia central (media aritmética, mediana) y de dispersión (desviación estándar); además, se corroboró su normalidad usando el Test de Shapiro-Wilk. Para realizar las comparaciones de los efectos bactericidas entre las muestras problemas y controles se aplicó la prueba Kruskal Wallis. Se trabajó con un nivel de significancia estadística  $p < 0,05$ .

### **3.8. Aspectos éticos de la investigación**

Debido a que *S. mutans* fue aislada de muestras de pacientes con caries dentales, se tuvo en cuenta las siguientes consideraciones éticas: El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Cajamarca (Anexo N° 2). Luego de la aprobación, se inició el estudio con los pacientes, a quienes se les explicó inicialmente los objetivos del estudio, la metodología y la confidencialidad de los datos; luego se les explicó y se tomó por escrito el consentimiento informado a cada paciente (Apéndice N°17).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Resultados

##### 4.1.1. Evaluación del efecto antibacteriano

###### a. Aceite esencial de salvia

El aceite esencial de salvia a diferentes concentraciones (100%, 50% y 25%) fue probado sobre 17 aislamientos procedentes de los pacientes con caries dental y sobre la cepa de referencia de *S. mutans*, además se utilizó como control la clorhexidina y como testigo alcohol al 96 %, obteniéndose halos de inhibición de distintos diámetros (Tabla 1) (Figura 1) (Apéndice N° 15).

Tabla 1. Promedio del diámetro de halo de inhibición (en mm) de diferentes concentraciones del aceite esencial de salvia y la clorhexidina sobre los aislamientos de *S. mutans*.

CÓDIGOS DE LA CEPAS	100%	AES 50%	25%	CHX 0,12%	ALC. 96%
ATCC	8,00	7,00	6,00	15,67	0
63,11CMVL	9,33	8,33	6,33	13,67	0
34CMVL	8,67	7,33	6,67	10,33	0
27CMVL	8,33	8,67	4,33	14,00	0
29.1CMVL	9,00	7,67	4,33	7,00	0
9CMVL	9,33	7,67	4,00	8,00	0
24CMVL	11,67	8,67	4,67	12,33	0
23CMVL	10,00	7,00	6,00	8,67	0
34.1CMVL	10,00	7,33	6,00	8,33	0
16CMVL	9,67	7,67	6,33	8,00	0
68.1CMVL	8,67	7,33	6,00	13,67	0
71.1CMVL	9,67	7,33	6,33	14,33	0
62CMVL	9,67	8,00	6,67	12,67	0
88CMVL	9,00	7,67	6,33	13,00	0
97CMVL	9,33	8,00	7,00	13,67	0
94CMVL	10,67	8,67	7,00	12,67	0
99CMVL	9,67	7,33	6,00	12,67	0
98CMVL	9,67	7,67	6,67	12,33	0

AES: Aceite esencial de salvia. CHX: clorhexidina. ALC.: alcohol





Figura 1. Efecto inhibitorio del aceite esencial de salvia a diferentes concentraciones sobre la cepa *S. mutans* 23CMVL.

Se determinó las principales medidas descriptivas de los valores de halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite de salvia y el control frente a *S. mutans*. El aceite de salvia al 100% presentó una mayor actividad antibacteriana con halos de inhibición mayores a 9 mm, en comparación con las concentraciones al 50 % y 25 %. En tanto que la clorhexidina, generó halos de inhibición mayor a 11 mm. La prueba de Kruskal Wallis detectó diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ), excepto entre la concentración al 100% y la clorhexidina (Tabla 2).

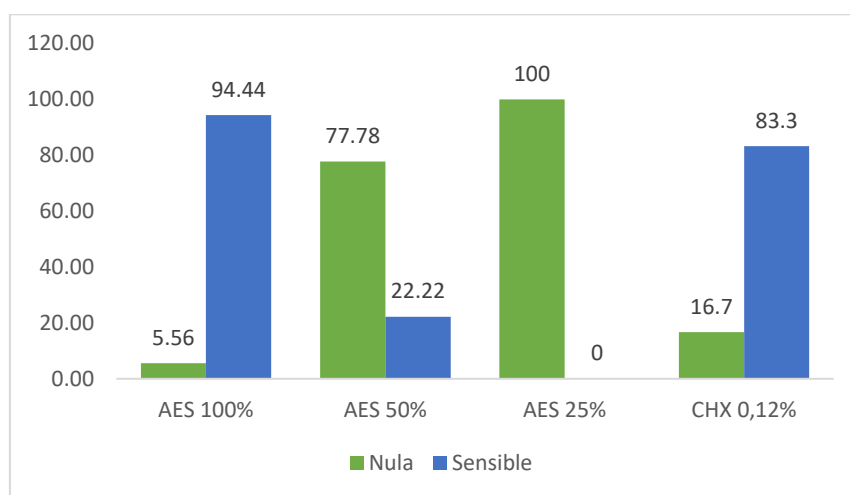
Tabla 2. Diámetro de halo de inhibición (en mm) del aceite esencial de salvia sobre *S. mutans*

Grupo	Media	Desviación estándar	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
<b>AES 100%</b>	9,46 <sup>a</sup>	0,85	9,50	7,00	16,00
<b>AES 50%</b>	7,74 <sup>b</sup>	0,54	7,67	7,00	9,00
<b>AES 25%</b>	5,93 <sup>c</sup>	0,94	6,17	0,00	7,00
<b>CHX 0,12%</b>	11,72 <sup>a</sup>	2,62	12,67	7,00	17,00

AES: Aceite esencial de salvia. CHX: Clorhexidina.

Valores con letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos, prueba de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

En relación al grado de sensibilidad, de acuerdo a lo establecido en la escala de Duraffourd, sólo las concentraciones del aceite de salvia al 50 % y 100 % presentaron efecto inhibitorio. La concentración al 100% tuvo un porcentaje de inhibición 94,44%, por otro lado, el porcentaje de inhibición disminuyó considerablemente en la concentración del 50%, observándose solo un 22,22% de inhibición, la concentración del 25 % no mostró efecto inhibitorio; en cuanto a la clorhexidina presentó un 83,3% de efecto inhibitorio. Al comparar los grupos y el grado de sensibilidad se observó diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 1).



AES: Aceite esencial de salvia. CHX: Clorhexidina.  $J_i^2$  de Pearson=45,78;  $p < 0,05$

Gráfico 1. Porcentaje de sensibilidad de *S. mutans* a diferentes concentraciones del aceite esencial de salvia según la escala de Duraffourd.

### b) Extractos acuosos

Los extractos acuosos de salvia y lloque, de manera individual y en mezcla, no evidenciaron un efecto inhibitorio significativo ya que los halos de inhibición presentaron un diámetro menor o igual a 7 mm (Tabla 3) (Figura 2), un valor que según la escala de Duraffourd indica un efecto nulo de inhibición de los extractos utilizados (Apéndice N° 16).

Tabla 3. Promedio del diámetro de halo de inhibición (en mm) de los extractos acuosos de salvia, lloque y la clorhexidina sobre los aislamientos de *S. mutans*.

CÓDIGOS DE LA CEPAS	EAS	EALL	MIX	CHX 0,12%
ATCC	6,67	6,00	6,00	14,33
63.11CMVL	6,00	6,00	6,00	12,67
34CMVL	6,00	6,00	6,00	8,67
27CMVL	6,67	6,33	6,00	11,67
29.1CMVL	6,33	6,00	6,00	8,33
9CMVL	6,67	6,33	6,00	9,33
24CMVL	6,67	6,67	6,00	11,00
23CMVL	6,00	6,00	6,00	9,33
34.1CMVL	6,33	6,00	6,00	9,67
16CMVL	6,00	6,00	6,00	8,67
68.1CMVL	7,00	6,33	6,00	11,67
71.1CMVL	6,00	6,00	6,00	10,00
62CMVL	6,33	6,33	6,00	11,67
88CMVL	6,33	6,33	6,00	13,00
97CMVL	6,00	6,00	6,00	10,67
94CMVL	6,33	6,00	6,00	12,00
99CMVL	6,00	6,00	6,00	9,33
98CMVL	7,00	6,00	6,00	11,33

EAS: Extracto acuoso de salvia. EALL: Extracto acuoso de lloque.  
 MIX: Mezcla de extractos acuosos de salvia y lloque. CHX: Clorhexidina.



Figura 2. Efecto inhibitorio nulo de los extractos de salvia y lloque de manera aislada y conjunta sobre la cepa *S. mutans* ATCC.

Se determinó las principales medidas descriptivas de los halos de inhibición de los extractos de salvia y lloque, de manera individual y en mezcla, cuyos valores fueron menores a 6,5 mm, en comparación con la clorhexidina que generó halos de inhibición mayor a 10 mm (Tabla 4).

Tabla 4. Diámetro de halo de inhibición (en mm) de los extractos acuosos de salvia y lloque sobre *S. mutans*

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Mediana</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>
<b>EAS</b>	6,35	0,35	6,33	6,00	7,00
<b>EALL</b>	6,13	0,20	6,00	6,00	6,67
<b>MIX</b>	6,00	0,00	6,00	6,00	6,00
<b>CHX 0,12%</b>	10,74	1,69	10,84	8,33	14,33

EAS: Extracto Acuoso de salvia. EALL: Extracto acuoso de Lloque. MIX: Mezcla de extractos acuosos de salvia y lloque. CHX: Clorhexidina.

#### 4.2. Discusión

La medicina tradicional ha demostrado tener efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades por los principios activos presentes en las especies vegetales (24). *Salvia macrophylla*, una de las especies más representativas de la familia *Rosaceae*, es una planta ampliamente utilizada en la medicina tradicional (25); así mismo, el lloque, planta nativa de Cajamarca, también es empleada con menor frecuencia para fines medicinales.

Durante la obtención de los aceites esenciales, el rendimiento de extracción del aceite de salvia fue 0,3% similar al reportado por Álvarez (26) en cuya investigación se evaluaron los diferentes rendimientos de extracción por arrastre de vapor de *Salvia sagittata* una especie de salvia similar a la utilizada en este estudio. El aceite extraído poseía las características esperadas ya que el olor *sui generis* y el tono ligeramente amarillo indicaban su alto grado de pureza, con respecto a su densidad se puede describir que era menor a la

del agua, esto pudo observarse durante la extracción al ubicarse en la parte superior de la pera de bromo. Por otro lado, no se obtuvo aceite esencial de lloque por lo que sería adecuado para este tipo de estudios utilizar otras técnicas de extracción, ya que Álvarez (26) también recomienda explorar nuevas técnicas para incrementar los rendimientos.

Los extractos acuosos obtenidos tenían características similares a las obtenidos por Castillo y Barreto (27) quienes describen con una coloración marrón, la cual adquiere tonalidades más claras al reducir su concentración, su olor *sui generis* y la ausencia de sólidos disueltos fueron indicadores de un adecuado método de extracción y ausencia de impurezas.

Durante el proceso de aislamiento es importante destacar ciertas diferencias bioquímicas en los aislamientos los cuales pudieron observarse gracias al sistema de identificación de estreptococos “STREPTO SYSTEM 12 R” las cuales fueron resumidas en el Apéndice N°12, estas características permitieron diferenciar a *S mutans* de las otras especies estreptococos, ya que estas últimas también pueden ser encontradas fácilmente en pacientes con caries dental tal y como lo resalta Matsumoto-Nakano (20). Por otro lado, las características morfológicas a nivel macroscópico y microscópico ayudaron significativamente en la identificación permitiendo diferenciar las características culturales propias de *S mutans* (7).

Durante el análisis del efecto antibacteriano se pudo evidenciar que la técnica de difusión en agar con disco era más efectiva que la técnica de difusión en agar con pozo, esto pudo deberse al alto contenido de compuestos volátiles presentes en el aceite esencial tal y como reportó Ben Khedher en su estudio de caracterización química y biológica del aceite esencial de *S. officinalis* (28). Utilizando la técnica de difusión en agar con disco se pudo observar halos de inhibición los cuales eran más notorios a una concentración de 100% , evidenciando en algunos aislamientos de *S. mutans* halos con un diámetro mayor a 11 mm,

lo cual indica una sensibilidad positiva de la bacteria a la concentración del 100% del aceite de salvia, también se observó sensibilidad en la concentración del 50%, pero no en la concentración del 25%, de allí que a medida que fue disminuyendo la concentración del aceite, los diámetros de los halos de inhibición disminuyeron gradualmente.

También es importante resaltar las diferencias en el efecto inhibitorio de la clorhexidina sobre las cepas aisladas y la cepa referencia *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ (Tabla 1), ya que estas presentaron distintos diámetros del halo lo que nos indica que dichas bacterias pueden presentar mecanismos de resistencia ante este antibiótico como lo descrito por Padilla (29), a diferencia de la cepa de referencia *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ que presentó la mayor sensibilidad al mismo. Tomando esto en cuenta, si bien las cepas identificadas con los códigos 29.1CMVL, 34.1CMVL y 16CMVL, presentaron una nula sensibilidad a la clorhexidina, si presentaron sensibilidad a la concentración del 100% del aceite esencial, con lo cual podríamos considerar el uso de este aceite contra bacterias que presentan resistencia a los antibióticos convencionales.

La prueba estadística determinó que entre el aceite a la concentración de 100 % y la clorhexidina no existe diferencia significativa, lo cual indicaría que las dos sustancias tendrían una acción inhibitoria similar sobre *S. mutans*. El notable efecto inhibitorio observado a esta concentración pudo deberse a la naturaleza química del aceite esencial, ya que Ntodini S. *et al* (30) observó a través de microscopía electrónica de barrido daños y alteraciones en la permeabilidad de la bicapa lipídica de *S. mutans* al interactuar con el aceite esencial de *Salvia officinalis* lo que provocó la pérdida del contenido celular (30). Otro factor importante en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de salvia son sus fitoconstituyentes, el  $\alpha$ - y  $\beta$ - pineno, 1,8-cineol que fueron reportados en investigaciones realizadas por Ben Khedher (28) y por Asadollahi M (12); Zhang informó que el  $\beta$  - pineno

es un componente relacionado con el efecto inhibitorio, ya que este compuesto tiene enlaces insaturados en su estructura molecular, que pueden proporcionar sitios de unión para los aminoácidos de la cadena lateral de Gtfs para disminuir la estabilidad de su estructura, alterando significativamente la formación de biofilms, y reduciendo la virulencia de *S. mutans* (21); sin embargo, se necesitan estudios futuros para aclarar el mecanismo preciso. Por otro lado en la investigación desarrollada por Park (31) se pudo comprobar que el monoterpeneo  $\alpha$  – pineno presentó un efecto importante sobre las propiedades cariogénicas como el crecimiento, la producción de ácido, la formación de biopelículas y la actividad bactericida en *S. mutans* (31). Asimismo, Rasooli (32) determinó que fitoconstituyentes como el  $\alpha$ - pineno y 1,8-cineol eran principios activos muy importantes durante la inhibición de la formación de biofilms por bacterias cariogénicas.

Los extractos acuosos no evidenciaron efecto inhibitorio ya que los halos observados poseían un diámetro inferior al valor establecido en la escala de Duraffourd (8mm), la ausencia del efecto inhibidor pudo deberse a distintos factores, como la concentración o el tipo de extracto empleado, por lo cual es importante resaltar que un estudio pudo obtener un efecto inhibitorio sobre la misma bacteria, con la principal diferencia que en dicho estudio se utilizó un extracto alcohólico (33).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- El aceite esencial de *Salvia macrophylla* L. (Salvia) a la concentración del 100% presentó un notable efecto antibacteriano, al 50% presentó un menor efecto antibacteriano y al 25% no presentó efecto antibacteriano *in vitro* sobre el crecimiento de *S. mutans*.
- Los extractos acuosos de *S. macrophylla* L. (Salvia), *K. lanceolata* Ruiz (Lloque) y la combinación de estos, no presentaron efecto antibacteriano *in vitro* sobre el crecimiento de *S. mutans*.
- Mediante el método de arrastre de vapor de agua no se llegó a obtener aceite esencial de *K. lanceolata* Ruiz (Lloque).



## 5.2.Recomendaciones

- Utilizar otros métodos de extracción de aceites esenciales para obtener el aceite esencial de *K. lanceolata* Ruiz (Lloque).
- Evaluar el efecto antibacteriano de otro tipo de extractos de *S. macrophylla* L.(salvia) y *K. lanceolata* Ruiz (Lloque), ya que los extractos acuosos no presentaron este efecto.

## LISTA DE REFERENCIAS

1. Piovesan C, Mendes FM, Antunes JLF, Ardenghi TM. Inequalities in the distribution of dental caries among 12-year-old Brazilian schoolchildren. *Braz Oral Res.* 2011;25(1):69–75.
2. Escribano M, Matesanz P, Bascones A. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Av en Periodoncia e Implantol Oral.* 2005 Aug;17(2):79–87.
3. Moreira MR, Souza AB, Moreira MA, Bianchi TC, Carneiro LJ, Estrela FT, et al. RP-HPLC analysis of manool-rich *Salvia officinalis* extract and its antimicrobial activity against bacteria associated with dental caries. *Rev Bras Farmacogn.* 2013;23(6):870–6.
4. Aguilar-Ancori EG, Aguilar-Ancori KV, Garay B, Mamani V, Quispe-Flórez MM. Actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* de aceites esenciales de cinco plantas alto andinas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2018 Apr 5;35(1):161.
5. Ghorbani A, Esmailizadeh M. Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *J Tradit Complement Med.* 2017;7(4):433–40.
6. Muñoz V, Sauvain M, Bourdy G, Arrázola S, Callapa J, Ruiz G, et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. *J Ethnopharmacol.* 2000 Jul;71(1–2):123–31.
7. Cheon K, Moser SA, Wiener HW, Whiddon J, Momeni SS, Ruby JD, et al. Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci.* 2013;121(3 PART1):148–55.
8. Salehi B, Albayrak S, Antolak H, Kręgiel D, Pawlikowska E, Sharifi-Rad M, et al. Aloe genus plants: From farm to food applications and phytopharmacotherapy. *Int*

J Mol Sci. 2018;19(9):49.

9. Hayouni EA, Chraief I, Abedrabba M, Bouix M, Leveau JY, Mohammed H, *et al.* Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *Int J Food Microbiol.* 2008;125(3):242–51.
10. Córdova-Guerrero I, Aragon-Martinez OH, Díaz-Rubio L, Franco-Cabrera S, Serafín-Higuera NA, Pozos-Guillén A, *et al.* Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. *Rev Argent Microbiol.* 2016;48(3):217–21.
11. Padilla Fernández EA. Formulación y control de calidad de un enjuague bucal elaborado a partir de los extractos totales de *Matricaria recutita* L. (Manzanilla) y de *Salvia officinalis* L. (Salvia). Vol. 3. 2015.
12. Asadollahi M, Firuzi O, Heidary Jamebozorgi F, Alizadeh M, Jassbi AR. Ethnopharmacological studies, chemical composition, antibacterial and cytotoxic activities of essential oils of eleven *Salvia* in Iran. *J Herb Med.* 2019;17–18:52.
13. Ccahuana Churata D, Larico Sancho IR. Evaluación del Efecto Antipirético y Antiinflamatorio del Extracto de Hojas de *Kageneckia lanceolata* (lloque) en Animales de Experimentación, Arequipa 2016. 2017.
14. Delporte C, Muñozb O, Rojas J, Ferrándiz M, Payá M, Erazo S, *et al.* Pharmacotoxicological Study of *Kageneckia oblonga*, Rosaceae. *Zeitschrift für Naturforsch C.* 2002 Feb 1;57(1–2):100–8.
15. Núñez DP, Bacallao LG. Bioquímica de la caries dental. *Rev Habanera Ciencias Medicas.* 2010;9(2):156–66.
16. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* 1980;44(2):331–84.
17. Riverón JDDE, Quiñonez JAP, Fuentes IHG. Caries dental y ecología bucal,

- aspectos importantes a considerar. Rev Cubana Estomatol. 2006;43(1):12.
18. Aguilera LA, Sánchez CG, Neri CA, Aceves MDC. *Streptococcus mutans* en saliva y su relación con caries dental. Rev ADM. 2009;66(6):48–56.
  19. Clarke TK. *Streptococcus mutans* and dental caries. BMJ. 1975;4:13.
  20. Matsumoto-Nakano M. Dental Caries. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Third Edit. Elsevier; 2014. p. 40–8.
  21. Zhang Q, Ma Q, Wang Y, Wu H, Zou J. Molecular mechanisms of inhibiting glucosyltransferases for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. Int J Oral Sci. 2021;13(1):1–8.
  22. Martínez M. A. Aceites Esenciales. Div Publicaciones UIS. 2001;34.
  23. Cueva Rosales J. Actividad Antimicrobiana Del Aceite Esencial De Romero (*Rosmarinus officinalis*) Frente Al Crecimiento De *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vitro. Lima 2016. 2017.
  24. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. 2013. 75 p.
  25. Pérez García W. Evaluación Etnobotánica Medicinal De La Comunidad De Buenos Aires, Jaén, Cajamarca – Perú. 2017.
  26. Alvarez Silguera JW, Ninahuana Jesus CA, Sanchez Reyes CA. Extracción y caracterización del aceite esencial de salvia (*Salvia sagittata*) mediante destilación con arrastre de vapor. Repos Inst – UNAC. 2018;78.
  27. Castillo Campos LA, Barreto SJ. Extractos de las Hojas de Salvia Officinalis y Sambucus Peruviana H.B.K. como Inhibidores de Incrustación. Ingeniería [Internet]. 2020 Mar 12;25(1):68–89. Available from: <https://revistas.udistrital.edu.co/index.php/reving/article/view/15329>
  28. Ben Khedher MR, Ben Khedher S, Chaieb I, Tounsi S, Hammami M. Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia.

- EXCLI J. 2017;16:160–73.
29. Carlos P, Olga L, Cristian V. Susceptibilidad de cepas de streptococcus mutans productores y no productores de biofilm, Frente a clorhexidina, triclosán y fluoruro de sodio utilizadas en colutorios orales. 2007;23–8.
  30. Ntondini SS, Lenetha G, Dzogbewu TC. Antimicrobial activity of *Salvia officinalis* against *Streptococcus mutans* causing dental implant failure: An in vitro study. J Int Oral Heal. 2021;13(5):499–507.
  31. Park B-I, You Y-O, Mo J-S, An S-Y, Choi N-Y, Kim K-J. Anti-cariogenic Properties of  $\alpha$ -Pinene, a Monoterpene in Plant Essential Oil. Int J Oral Biol. 2017;42(1):25–31.
  32. Rasooli I, Shayegh S, Taghizadeh M, Astaneh SDA. Phytotherapeutic prevention of dental biofilm formation. Phyther Res. 2008 Sep;22(9):1162–7.
  33. Chota Vidal LR, Chirinos Rodríguez JM. Efecto antibacteriano in vitro del extracto de *Tropaeolum majus* en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Univ Nac Trujillo [Internet]. 2018;1:67. Available from: <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2224192>

## APÉNDICES

### Apéndice N° 1. Material utilizado para toma de muestra de pacientes con caries dental

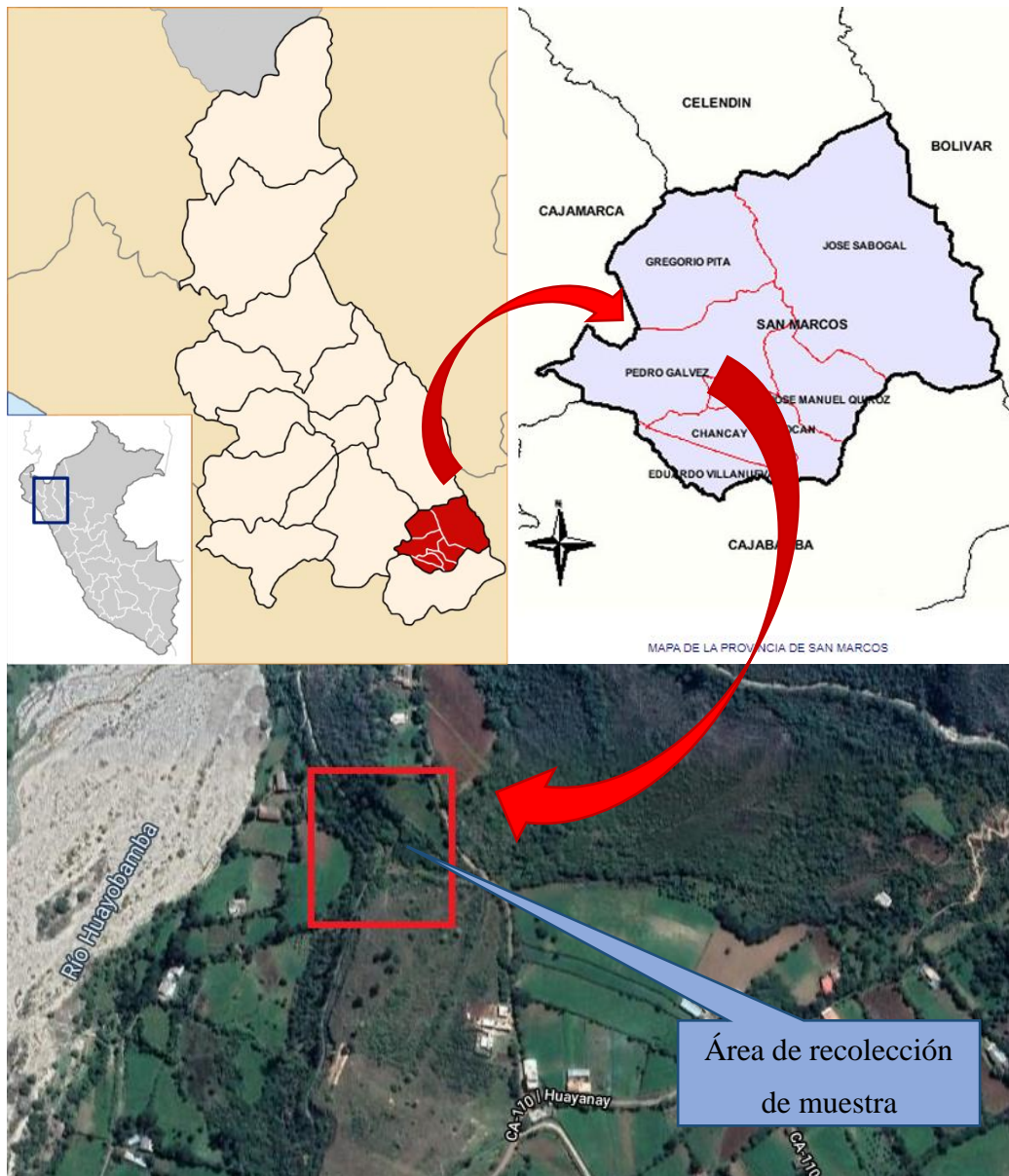


Material para mantener la cadena de frio durante la toma de muestra.



Muestras recolectadas en caldo BHI de pacientes con caries dental.

## Apéndice N° 2. Lugar de recolección del material vegetal



Apéndice N° 3. Especies vegetales



*Salvia macrophylla* L. (salvia).



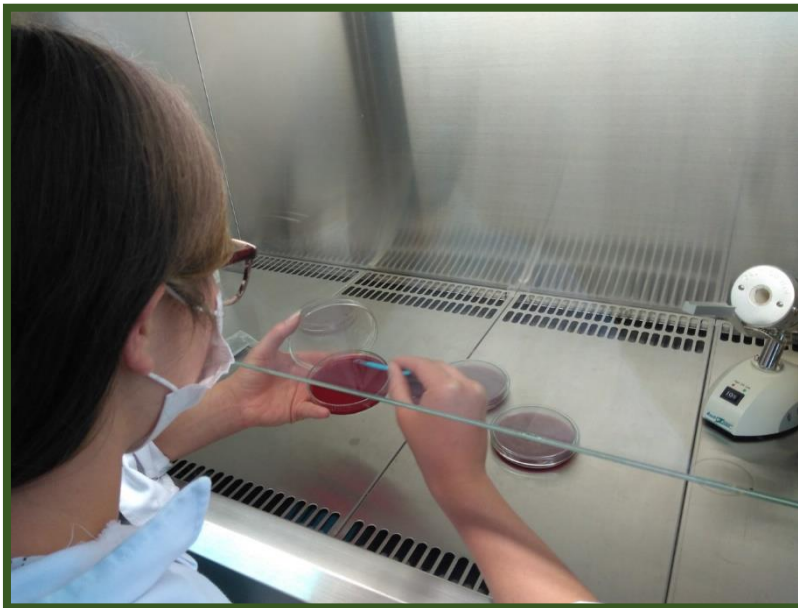
*Kageneckia lanceolata* Ruiz. (lloque).



#### Apéndice N° 4. Reactivación de cepa de referencia de *S. mutans* ATCC® 25175™



Cepa de referencia *S. mutans* ATCC® 25175™.



Reactivación de la cepa *S. mutans* ATCC® 25175.

## Apéndice N° 5. Aislamiento de *S. mutans*



Homogenización de muestras en Vórtex.

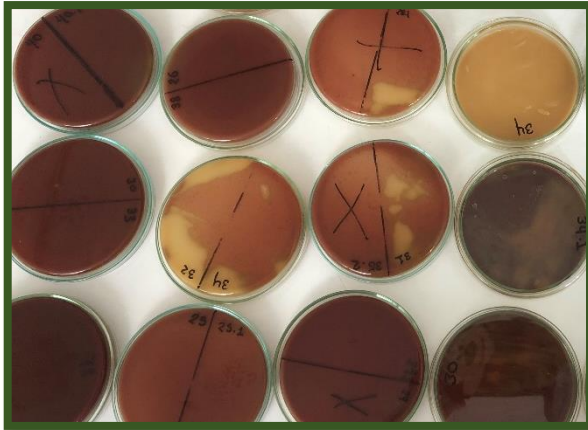


Siembra de cepas por estría en placas con agar sangre.



Incubación de las cepas en anaerobiosis a 37 °C por 48 - 72 horas.

**Apéndice N° 6. Identificación de aislamientos y cepa de referencia de *S. mutans* ATCC® 25175™**



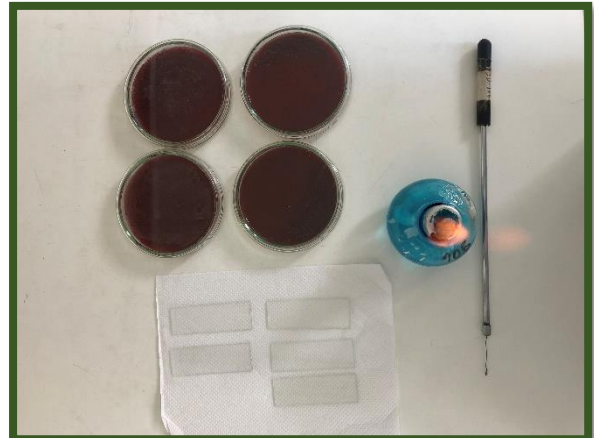
Selección de las colonias con las características correspondientes.



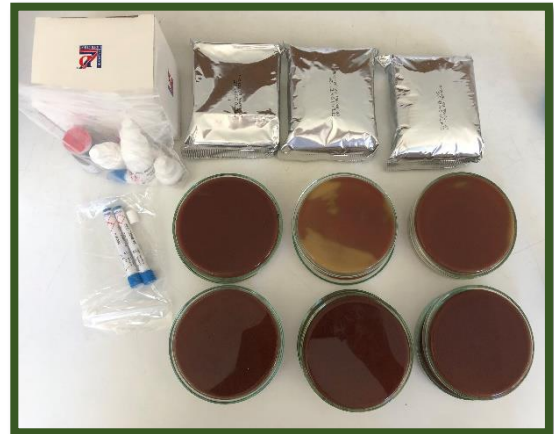
Coloración Gram.



Laminas fijadas con las colonias aisladas, para observación microscópica.



Prueba de la catalasa.



Sistema de identificación de estreptococos.



Contenido del Kit de identificación STREPTO SYSTEM 12R.

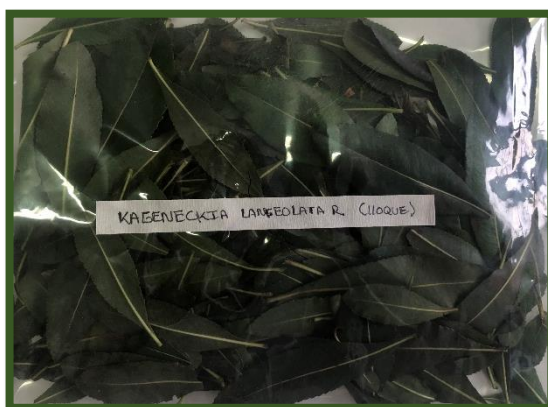


Ensayo realizado para evaluar el perfil bioquímico de las cepas seleccionadas.

**Apéndice N° 7. Obtención de aceites esenciales a partir de *S. macrophylla* L. (salvia) y *K. lanceolata* Ruiz. (lloque)**



Recolección de muestras vegetales *S. macrophylla* L. (salvia) y *K. lanceolata* Ruiz.(lloque).



Selección de la muestra vegetal.



Sistema de extracción por arrastre de vapor.

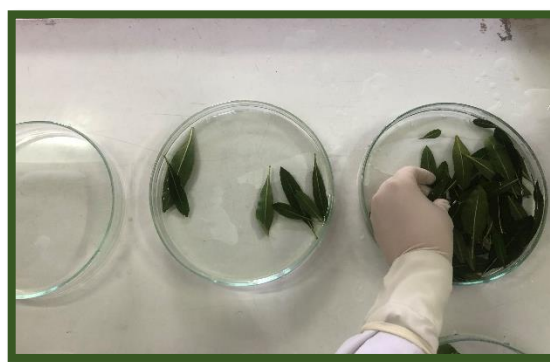


Se procedió a obtener el aceite esencial por el método de arrastre de vapor de agua.

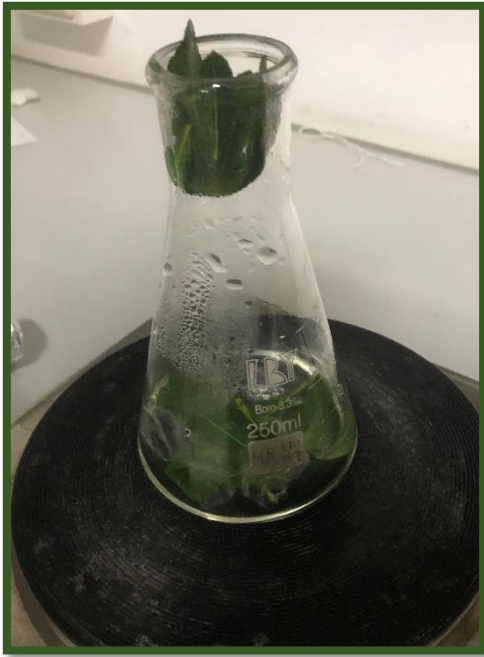
**Apéndice N° 8. Obtención de extractos acuosos a partir de *S. macrophylla* L. (salvia) y *K. lanceolata* Ruiz. (lloque)**



Pesaje de material vegetal.



Lavado de hojas de salvia y lloque con agua destilada.



Obtención de extractos acuoso.



**Apéndice N° 9. Evaluación de efecto antibacteriano: método de difusión en agar con disco**

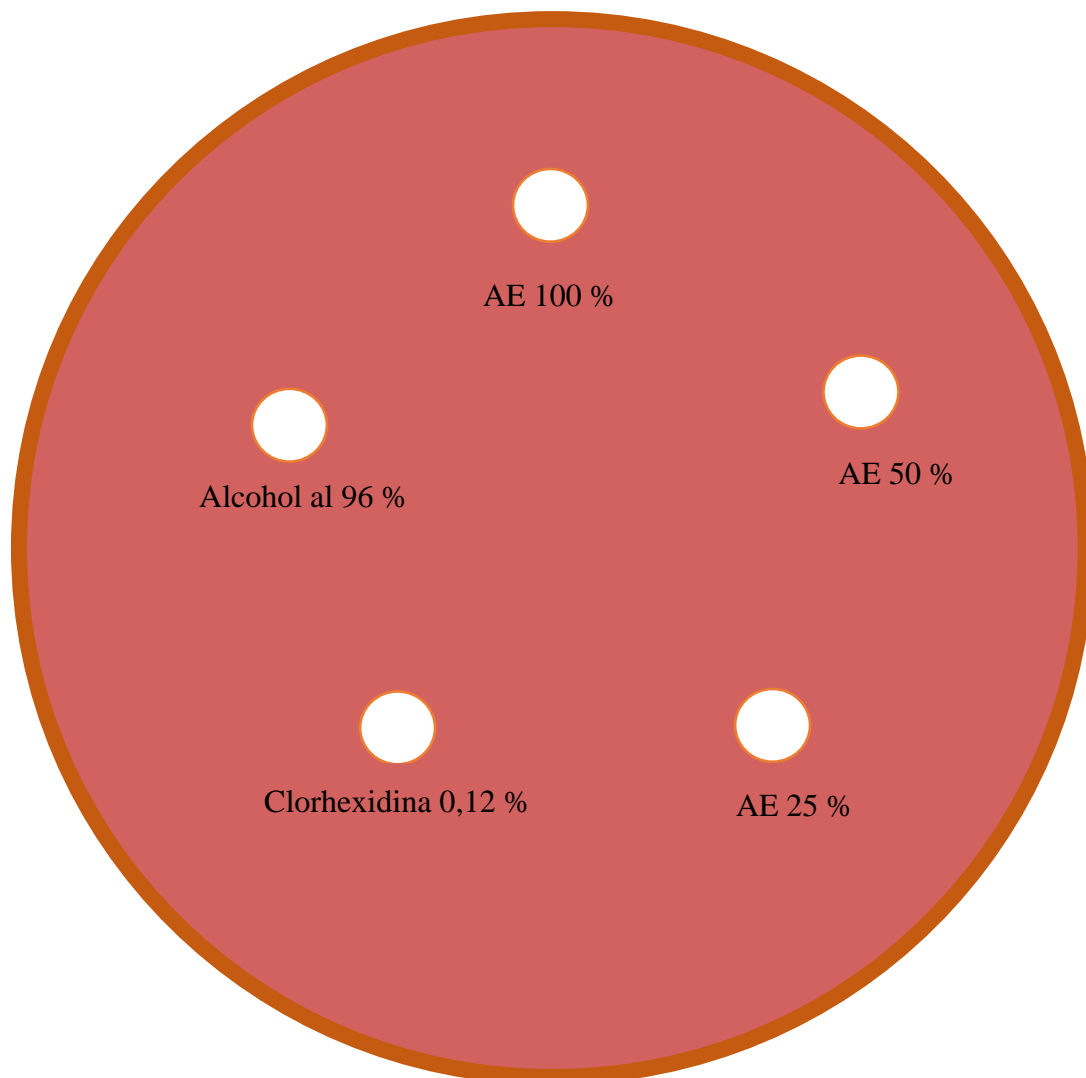


Ajuste de inóculo hasta la turbidez N° 0,5 en la escala de Mac Farland.

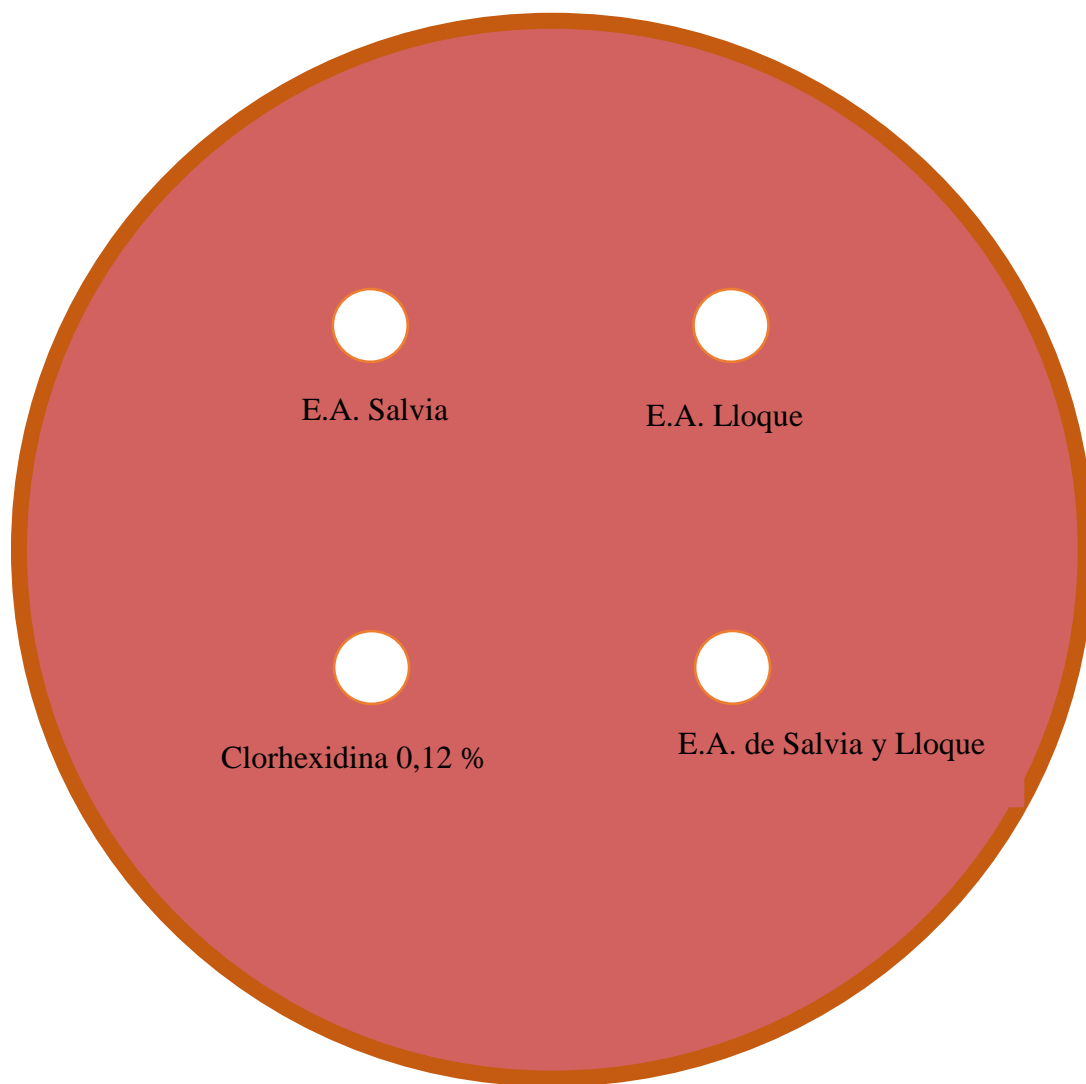


Colocación de discos embebidos con el aceite esencial.

**Apéndice N° 10. Distribución de los discos para la evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial**



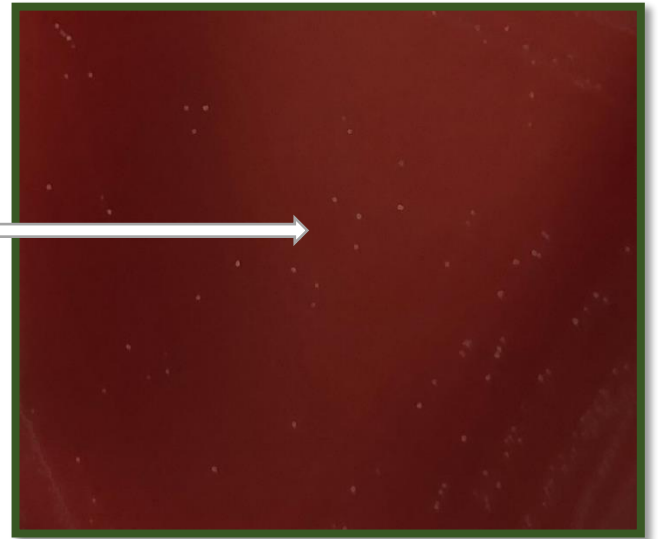
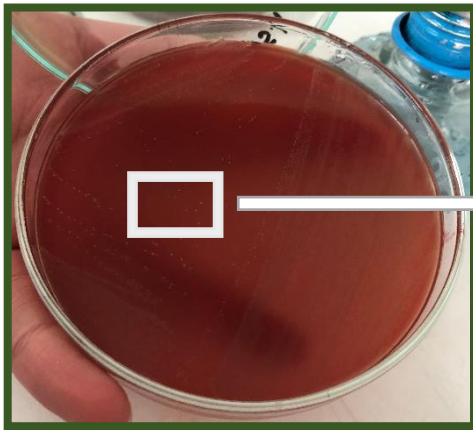
**Apéndice N° 11. Distribución de los discos para la evaluación de efecto antibacteriano de los extractos acuosos**



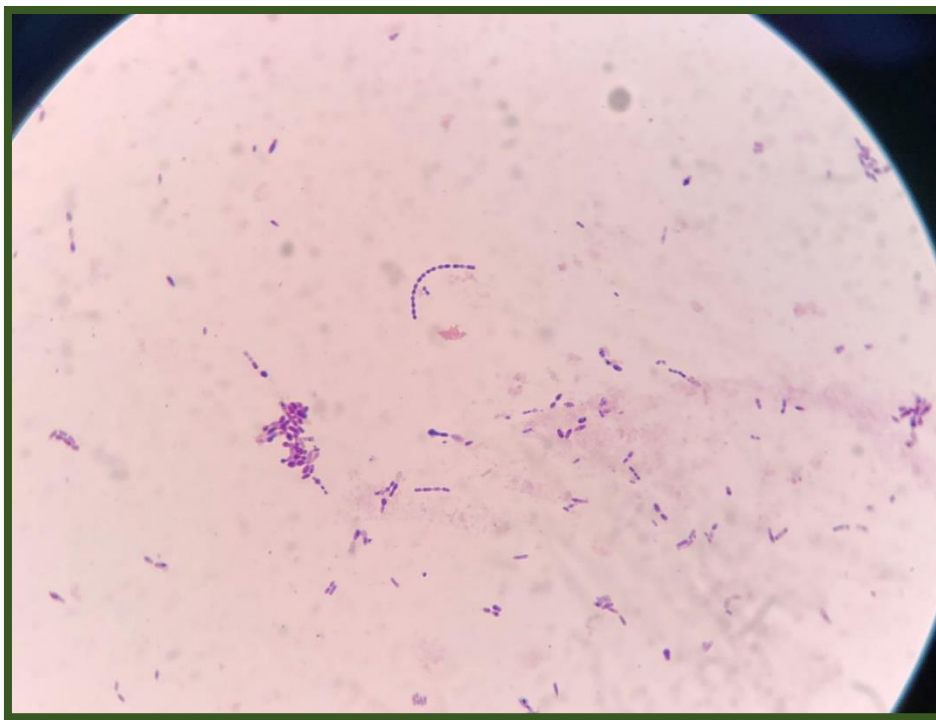
**Apéndice N° 12. Identificación bioquímica de estreptococos utilizando el sistema STREPTO SYSTEM 12R**

CÓDIGO DE CEPA	VP	IPP	ESC	PYR	ONPG	ADC	RIB	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	HEMÓLISIS	CÓDIGO	NOMBRE DEL MICROORGANISMO
ATCC	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
8CMVL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	α	0200	s. mitis
7CMVL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0200	s. mitis
32CMVL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0200	s. mitis
90.1CMVL	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	2053	S. viridans
31CMVL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2002	S. viridans
91CMVL	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	3412	S. agalactiae
18CMVL	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	0411	s. epidermidis
39CMVL	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	α	2200	s. mitis
73CMVL	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	0200	s. mitis
9CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
16CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
23CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
24CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
27CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
34.1CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
29.1CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
34CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
12CMVL	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	4402	s. sanguis I
71.1CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
68.1CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
62CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
63.11CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
88 CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
97CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
99CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
94CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	α	5047	S. mutans
98CMVL	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	5047	S. mutans
35.1CMVL	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	4402	S. sanguis I - S. Suis
33CMVL	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	0204	s. sanguis II
59CMVL	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	4602	S. suis I
26CMVL	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	6057	S. viridans
38CMVL	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	α	2157	S. viridans
30CMVL	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	2007	S. viridans

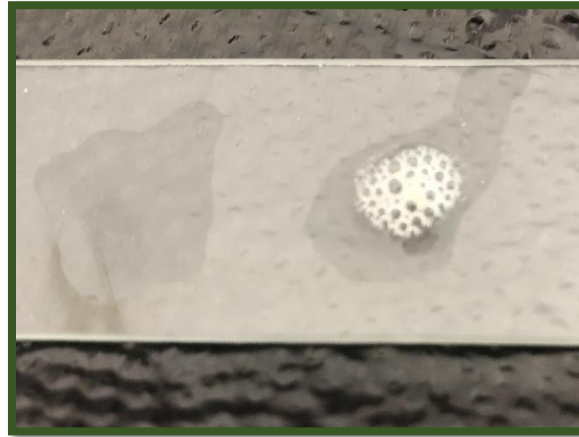
Apéndice N° 13. Aislamiento e identificación de cepas aisladas de *S. mutans*



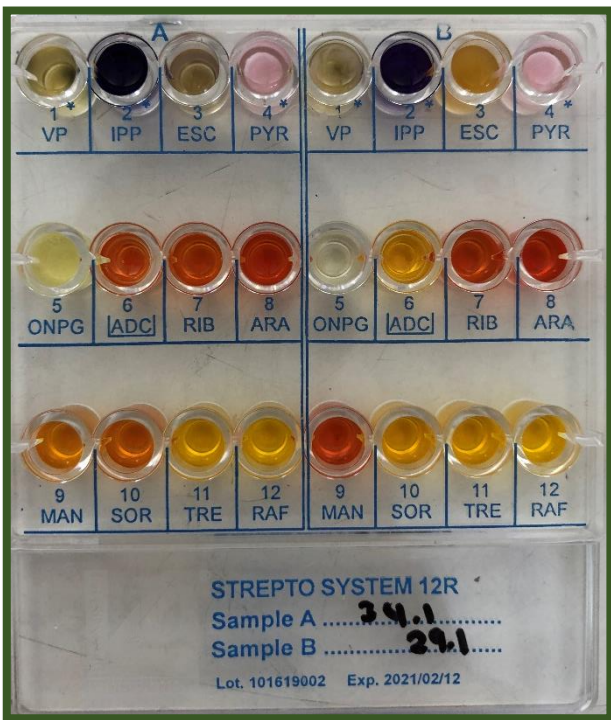
Colonias aisladas de *S. mutans* en agar sangre.



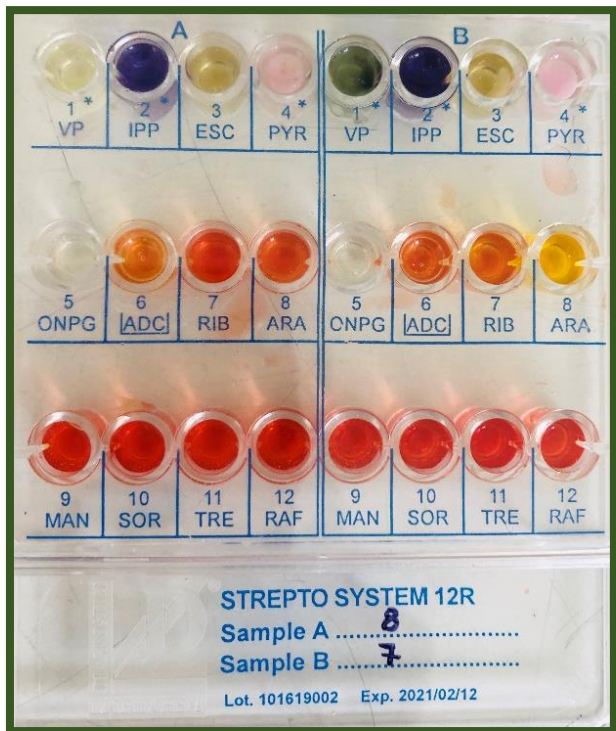
Observación microscópica de Tinción Gram *S. mutans* aisladas – 1000X.



Prueba de catalasa negativa y positiva respectivamente.



Perfil bioquímico de las cepas *S. mutans* 34.1CMVL y 29.1CMVL.



Perfil bioquímico de las cepas *S. acidominimus* 8CMVL y 7CMVL.



Conservación de las cepas aisladas en BHI y glicerol a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Apéndice N° 14. Obtención de aceites esenciales y extractos acuosos a partir de *S. macrophylla* L. (salvia) Y *K. lanceolata* Ruiz. (lloque)**



Aceites esenciales de *S. macrophylla* L. (salvia).

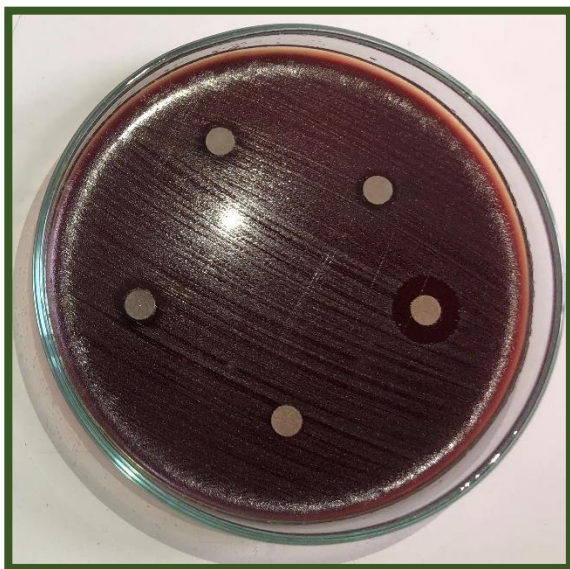


Extractos acuosos de *S. macrophylla* L. (salvia) y *K. lanceolata* Ruiz (lloque).

**Apéndice N° 15. Evaluación del efecto antibacteriano del aceite esencial de salvia.**

CÓDIGOS DE LA CEPAS	PLACA 1					PLACA 2					PLACA 3				
	100%	50%	25%	CHX	ALC. 96%	100%	50%	25%	CHX	ALC. 96%	100%	50%	25%	CHX	ALC. 96%
ATCC	9	7	6	17	0	7	7	6	16	0	8	7	6	14	0
63.11CMVL	8	7	7	15	0	10	9	6	13	0	10	9	6	13	0
34CMVL	8	7	7	8	0	9	7	6	9	0	9	8	7	14	0
27CMVL	8	9	7	14	0	8	9	6	14	0	9	8	0	14	0
29.1CMVL	10	8	7	7	0	7	7	6	7	0	10	8	0	7	0
9CMVL	9	8	6	9	0	10	8	6	8	0	9	7	0	7	0
24CMVL	10	8	7	12	0	16	9	7	12	0	9	9	0	13	0
23CMVL	9	7	6	9	0	13	7	6	10	0	8	7	6	7	0
34.1CMVL	11	7	6	8	0	9	7	6	7	0	10	8	6	10	0
16CMVL	10	9	7	8	0	11	7	6	8	0	8	7	6	8	0
68.1CMVL	8	7	6	13	0	10	7	6	14	0	8	8	6	14	0
71.1CMVL	9	8	6	14	0	11	7	6	15	0	9	7	7	14	0
62CMVL	10	8	7	12	0	9	8	7	13	0	10	8	6	13	0
88CMVL	9	8	6	14	0	10	8	7	14	0	8	7	6	11	0
97CMVL	10	8	7	11	0	9	8	7	14	0	9	8	7	16	0
94CMVL	10	8	7	13	0	12	9	7	13	0	10	9	7	12	0
99CMVL	9	7	6	13	0	10	7	6	14	0	10	8	6	11	0
98CMVL	9	8	6	12	0	11	8	7	15	0	9	7	7	10	0

Medida de los diámetros de los halos de inhibición en mm del aceite esencial de salvia.



**CEPA 94CMVL**



**CEPA ATCC**





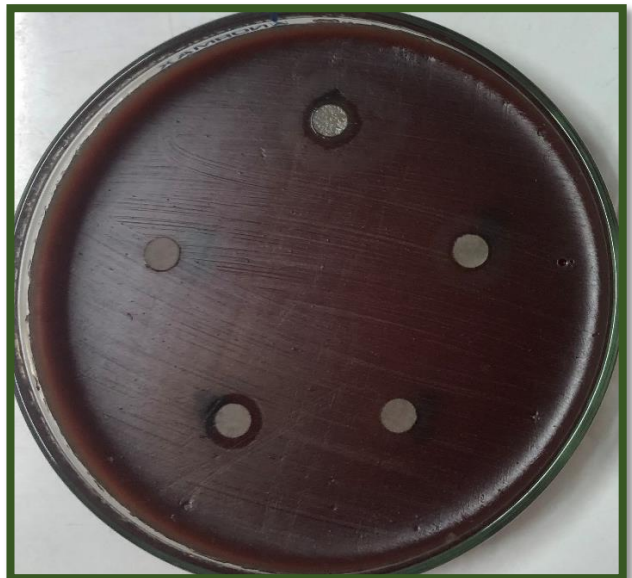
**CEPA 63.11CMVL**



**CEPA 23CMVL**



**CEPA 9CMVL**



**CEPA 16CMVL**

**Apéndice N° 16. Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos acuosos.**

CÓDIGO DE LAS CEPAS	PLACA 1				PLACA 2				PLACA 3			
	E.A.S	E.A.L.	MIX	CHX	E.A.S	E.A.L.	MIX	CHX	E.A.S	E.A.L.	MIX	CHX
ATCC	7	6	6	15	6	6	6	14	7	6	6	14
63.11CMVL	6	6	6	13	6	6	6	12	6	6	6	13
34CMVL	6	6	6	8	6	6	6	9	6	6	6	9
27CMVL	6	6	6	12	7	7	6	12	7	6	6	11
29.1CMVL	7	6	6	8	6	6	6	9	6	6	6	8
9CMVL	7	7	6	9	6	6	6	9	7	6	6	10
24CMVL	7	6	6	12	6	7	6	11	7	7	6	10
23CMVL	6	6	6	9	6	6	6	10	6	6	6	9
34.1CMVL	6	6	6	10	7	6	6	9	6	6	6	10
16CMVL	6	6	6	10	6	6	6	8	6	6	6	8
68.1CMVL	7	7	6	11	7	6	6	13	7	6	6	11
71.1CMVL	6	6	6	9	6	6	6	11	6	6	6	10
62CMVL	6	6	6	12	7	7	6	11	6	6	6	12
88CMVL	6	6	6	13	7	7	6	14	6	6	6	12
97CMVL	6	6	6	10	6	6	6	12	6	6	6	10
94CMVL	7	6	6	11	6	6	6	13	6	6	6	12
99CMVL	6	6	6	9	6	6	6	10	6	6	6	9
98CMVL	7	6	6	11	7	6	6	12	7	6	6	11

Medida de los diámetros de los halos de inhibición en mm de los extractos acuosos de salvia y lloque.



**CEPA ATCC**

## **Apéndice N° 17. Consentimiento para participar en un estudio de investigación**

### **- ADULTOS -**

Institución: Universidad Nacional de Cajamarca - UNC

Investigador: Bach. Vigo Lezma Celmira Medalith (Investigadora Principal)  
Dra. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa (Co-investigadora)

Título: Efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (salvia) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz. (lloque) sobre *Streptococcus mutans*

#### **¿De qué se trata el estudio?:**

Lo estamos invitando a participar en un estudio llamado: “Efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (salvia) y *Kageneckia lanceolata* Ruiz. (lloque) sobre *Streptococcus mutans*”. Este es un estudio desarrollado por una investigadora de la Universidad Nacional de Cajamarca, para evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* (salvia) y *Kageneckia lanceolata* (lloque) sobre el crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de pacientes con caries dental.

La información de este estudio será de mucha importancia y servirá para mejorar las medidas que se realiza para el tratamiento de caries dental.

La caries dental es una enfermedad infecciosa, crónica, transmisible y de origen multifactorial, siendo la principal causa de la perdida de los dientes en la población, por lo que se considera un problema de salud pública en diferentes países. La bacteria involucrada directamente en esta enfermedad es *Streptococcus mutans*, existe muchos fármacos sintéticos para tratar esta enfermedad, pero tienen efectos secundarios es por ello que se quiere probar el efecto antibacteriano de estas dos especies para finalmente elaborar un enjuague bucal natural que no produciría efectos secundarios como los enjuagues comerciales.

#### **¿Cómo voy a participar?:**

Si usted acepta participar en este estudio, le pediremos que firme este formato de consentimiento informado por duplicado, y le entregaremos una copia. Luego se realizará lo siguiente:

Asistirá al consultorio odontológico de costumbre y antes de la intervención del dentista, con un hisopo estéril se rosará el diente indicado. Todo en supervisión del odontólogo.

El análisis de las muestras obtenidas estará a cargo del Laboratorio de la Universidad Nacional de Cajamarca.

#### **¿Existen riesgos para usted al participar en el estudio?**

No se prevén riesgos para usted por participar del estudio.

### **¿Tendré algún beneficio económico por participar en el estudio?**

Usted NO recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole, únicamente la satisfacción de participar para un mejor entendimiento del efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de salvia y lloque sobre *Streptococcus mutans*.

### **¿Quién va a saber que estamos participando en el estudio?**

Nosotros guardaremos la información de usted con códigos y no con nombres. Si los resultados de este estudio son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Los archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin su consentimiento.

### **¿A quién llamo si quiero hacer preguntas sobre el estudio?**

Si tiene alguna duda adicional, llamar a la Dra. Claudia Rodríguez al teléfono 976996558 o a la Bach. Vigo Lezma Celmira Medalith al teléfono 978697759.

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio y sus derechos como participante, puede contactar al Comité Institucional de Ética de la Universidad Nacional de Cajamarca.

## **CONSENTIMIENTO**

Después de haber comprendido la información proporcionada y que he tenido la oportunidad de formular mis preguntas y dudas, las que han sido contestadas y aclaradas, acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo que no hay mayor riesgo ni peligro que pueda pasar si participo en el proyecto. Recibiré una copia firmada de este consentimiento.

Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmamos este documento a los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Participante

Nombre:

DNI:

\_\_\_\_\_

Investigador

Nombre:

DNI:

\_\_\_\_\_

Testigo (Si participante es iletrado)

Nombre:

DNI:

## ANEXOS

### Anexo N°1. Sistema de identificación STREPTO SYSTEM 12R



## STREPTOSYSTEM 12R

System for the identification of Streptococci.

Ref. 72560 - 79560

Contents	Page
Italiano	1
English	6



# STREPTOSYSTEM 12R

ENGLISH
---------

System for the identification of Streptococci.

## DESCRIPTION

STREPTOSYSTEM 12R is a 24-well system containing 12 x 2 desiccated biochemical substrata for the identification of streptococci.

Each system allows the performance of two tests and is inoculated with the bacterial suspension of the microorganism to test. Incubation at 36±1°C for 18-24 hours.

The microorganism is identified by assessing the color change of the various wells in order to determine the corresponding numerical code.

## CONTENT OF THE PACKAGE

Ref. 72560	Ref. 79560
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 Systems STREPTOSYSTEM 12R (40 tests)</li> <li>• 40 Vial of Inoculum Strepto Broth (5.0 mL)</li> <li>• 2 Cartridges of PYR-Disc</li> <li>• 1 Vial of PYR Reagent (5.0 mL)</li> <li>• 1 Vial of Ninhydrin Reagent (5.0 mL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 Systems STREPTOSYSTEM 12R (8 tests)</li> <li>• 8 Vial of Inoculum Strepto Broth (5.0 mL)</li> <li>• 1 Cartridge of PYR-Disc</li> <li>• 1 Vial of PYR Reagent (5.0 mL)</li> <li>• 1 Vial of Ninhydrin Reagent (5.0 mL)</li> </ul>

## NECESSARY ITEMS NOT CONTAINED IN THE PACKAGE

• VP Reagent (ref. 87002).	• Vaseline oil (ref. 87006)
----------------------------	-----------------------------

## PRINCIPLE OF THE METHOD

STREPTOSYSTEM 12R allows the identification of streptococci on the basis of biochemical tests performed in the wells containing specific culture media.

The combination of positive and negative reactions allows to determine a numerical code that in turn permits to identify the examined bacterium by using the Codes table or the Software on-line.

## CONFIGURATION

Well	BIOCHEMICAL REACTIONS STREPTOCOCCI IDENTIFICATION
1-VP *	Production of acetoin (Voges-Proskauer test)
2-IPP *	Hydrolysis of hippurate
3-ESC	Hydrolysis of esculin
4-PYR *	Hydrolysis of pirrolidonil-β-naftilammide (PYR test)
5-ONPG	Hydrolysis of ONPG (ortho-nitrophenyl-β-galactoside)
6-ADC □	Decarboxylation of arginine
7-RIB	Fermentation of ribose
8-ARA	Fermentation of arabinose
9-MAN	Fermentation of mannitol
10-SOR	Fermentation of sorbitol
11-TRE	Fermentation of trehalose
12-RAF	Fermentation of raffinose

□ : after inoculation, overlay the well with vaseline oil

\* : after incubation, add the indicated reagent

**TEST PROCEDURE****PREPARATION OF THE BACTERIAL SUSPENSION**

1. The microorganism to be identified must be recently isolated (18-24 h); bacteria cultures older than 48 hours can provide not reliable results.
2. Take one or more morphologically similar, well-isolated colonies from the agar culture medium and suspend in Inoculum Strepto Broth contained in the package.

**INOCULUM OF THE SYSTEM**

1. Take a system from its wrapper and bring it to room temperature.
2. Write down patient's name, date and origin of the microorganism.
3. Transfer 0.2 mL of bacterial suspension into each well of the system.
4. Deposit a **PYR-Disc** into the well **1-PYR**.
5. Overlay with 1 drop of vaseline oil the well **6-ADC**.
6. Cover the system with the lid provided and incubate at  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  for 18-24 hours.

**INTERPRETATION OF RESULTS**

At the end of the incubation period:

1. Add 2 drops of Alpha-naphthol and 1 drop of NaOH 40% (ref. 80252) into the well **1-VP**;
2. Add 2 drops of Ninhydrin Reagent into the well **2-IPP**;
3. Add 2 drops of PYR Reagent into the well **4-PYR**;
4. Wait for 15-20 minutes and watch for the color change in the wells. Interpret the results using the interpretative table.
5. Note the results on the Test Results Form and determine the 4-digit code by following instructions provided in the NUMERICAL CODE FORMATION paragraph.
6. Identify the microorganism by using the Codes table or the Software on-line.

**Interpretative table.**

Well	REACTIONS FOR THE BIOCHEMICAL IDENTIFICATION	Well color	
		Positive reaction	Negative reaction
<b>1-VP</b>	VP test	pink-red	yellow
<b>2-IPP</b>	Hippurate hydrolysis	blue-violet	colorless
<b>3-ESC</b>	Esculin hydrolysis	black-brown	yellow
<b>4-PYR</b>	PYR test	pink-fuchsia disc	light pink disc
<b>5-ONPG</b>	ONPG hydrolysis	yellow	colorless
<b>6-ADC</b>	Arginine decarboxylation	red	yellow-orange
<b>7-RIB</b>	Ribose fermentation	yellow-orange	red
<b>8-ARA</b>	Arabinose fermentation	yellow-orange	red
<b>9-MAN</b>	Mannose fermentation	yellow-orange	red
<b>10-SOR</b>	Sorbitol fermentation	yellow-orange	red
<b>11-TRE</b>	Trehalose fermentation	yellow-orange	red
<b>12-RAF</b>	Raffinose fermentation	yellow-orange	red

**NUMERICAL CODE FORMATION**

The biochemical tests are separated into 4 groups of 3 and a value of 1, 2 or 4 is indicated for each:

- Value 1 : first test positive in each group (VP, PYR, RIB, SOR).
- Value 2 : second test positive in each group (IPP, ONPG, ARA, TRE).
- Value 4 : third test positive in each group (ESC, ADC, MAN, RAF).
- Value 0 : every negative test

A 4-digit code is obtained by adding together the values corresponding to positive reactions within each group. The code allows the identification of the organism under examination by using the Codes Table. The example below shows how a numerical code can be formed.

**Example.**

Test	Group 1			Group 2			Group 3			Group 4		
	VP	IPP	ESC	PYR	ONPG	ADC	RIB	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF
Values	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Results	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
Sum of values	0			5			0			2		
CODE 0502	IDENTIFICATION: <i>Streptococcus pyogenes</i>											

SCHEME OF REACTIONS													
Microorganism	VP	IPP	ESC	PYR	ONPG	ADC	RIB	ARA	MAN	SOR	TRE	RAF	Hemolysis
<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	β
<i>S. agalactiae</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-β
<i>S. epidermidis</i>	-	-	±	-	-	+	+	-	-	+	-	-	β
<i>S. dysgalactiae</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	±	+	-	-α
<i>S. equi</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	β
<i>E. faecalis</i>	+	±	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-α
<i>E. faecium</i>	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-α
<i>E. casseliflavus</i>	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-α
<i>S. durans</i>	+	±	+	+	±	+	+	-	-	-	±	-	-α/β
<i>S. bovis</i> I	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-α
<i>S. bovis</i> II	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	±	+	-α
<i>S. equinus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-α
<i>E. avium</i>	+	-	+	+	-	-	+	±	+	+	+	-	-α
<i>S. milleri</i> I	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±	β
<i>S. milleri</i> II	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	α/β
<i>S. sanguis</i> I	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	±	α
<i>S. sanguis</i> II	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	±	+	α
<i>S. salivarius</i>	+	-	+	-	±	-	-	-	-	-	±	+	-
<i>S. mitis</i>	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	α
<i>S. pneumoniae</i>	-	-	±	-	+	±	-	-	-	-	+	+	α
<i>S. mutans</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-α
<i>S. lactis</i>	+	-	+	±	±	+	+	-	±	-	+	-	-α
<i>S. suis</i> I	-	-	+	±	±	+	-	-	-	-	+	-	α
<i>S. suis</i> II	-	-	±	±	±	+	-	-	-	-	+	+	α
<i>S. uberis</i>	+	+	+	±	-	+	+	-	+	+	+	-	-α
<i>S. acidominimus</i>	-	+	±	±	-	-	±	-	±	-	±	-	α
<i>S. viridans</i>	-	+	±	±	-	-	±	-	±	±	+	±	α

+: positive reaction      -: negative reaction      ±: variable reaction



## Codes table.

Code	Microorganism	Code	Microorganism
0000	<i>S. mitis</i>	5047	<i>S. mutans</i>
0004	<i>S. sanguis</i> II	5153	<i>E. avium</i>
0006	<i>S. sanguis</i> II	5173	<i>E. avium</i>
0200	<i>S. mitis</i>	5204	<i>S. salivarius</i>
0204	<i>S. sanguis</i> II	5206	<i>S. salivarius</i>
0206	<i>S. sanguis</i> II <i>S. pneumoniae</i>	5402	<i>S. milleri</i> II
0400	<i>S. equi</i>	5412	<i>S. lactis</i>
0406	<i>S. suis</i> II	5452	<i>S. lactis</i>
0411	<i>S. epidermidis</i>	5512	<i>S. durans</i> <i>S. lactis</i>
0412	<i>S. dysgalactiae</i>	5510	<i>S. durans</i>
0413	<i>S. dysgalactiae</i>	5552	<i>S. lactis</i>
0502	<i>S. pyogenes</i>	5553	<i>E. faecalis</i>
0506	<i>S. suis</i> II	5710	<i>S. durans</i>
0604	<i>S. sanguis</i> II	5712	<i>S. durans</i>
0606	<i>S. equi</i>	5752	<i>S. lactis</i>
0706	<i>S. suis</i> II	5772	<i>E. faecium</i>
1400	<i>S. milleri</i> I	5776	<i>E. casseliflavus</i>
1404	<i>S. milleri</i> I	6000	<i>S. acidominimus</i>
2000	<i>S. acidominimus</i>	6002	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>
2002	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>	6003	<i>S. viridans</i>
2003	<i>S. viridans</i>	6007	<i>S. viridans</i>
2007	<i>S. viridans</i>	6010	<i>S. acidominimus</i>
2010	<i>S. acidominimus</i>	6012	<i>S. viridans</i>
2012	<i>S. viridans</i>	6013	<i>S. viridans</i>
2013	<i>S. viridans</i>	6017	<i>S. viridans</i>
2017	<i>S. viridans</i>	6050	<i>S. acidominimus</i>
2050	<i>S. acidominimus</i>	6052	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>
2052	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>	6053	<i>S. viridans</i>
2053	<i>S. viridans</i>	6010	<i>S. acidominimus</i>
2057	<i>S. viridans</i>	6012	<i>S. viridans</i>
2100	<i>S. acidominimus</i>	6013	<i>S. viridans</i>
2102	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>	6017	<i>S. viridans</i>
2103	<i>S. viridans</i>	6050	<i>S. acidominimus</i>
2107	<i>S. viridans</i>	6052	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>
2110	<i>S. acidominimus</i>	6053	<i>S. viridans</i>
2112	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>	6057	<i>S. viridans</i>
2113	<i>S. viridans</i>	6100	<i>S. acidominimus</i>
2117	<i>S. viridans</i>	6103	<i>S. viridans</i>
2150	<i>S. acidominimus</i>	6107	<i>S. viridans</i>
2152	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>	6110	<i>S. acidominimus</i>
2153	<i>S. viridans</i>	6112	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>
2157	<i>S. viridans</i>	6113	<i>S. viridans</i>
3412	<i>S. agalactiae</i>	6117	<i>S. viridans</i>
4402	<i>S. sanguis</i> I <i>S. suis</i> I	6150	<i>S. acidominimus</i>
4206	<i>S. pneumoniae</i>	6152	<i>S. acidominimus</i> <i>S. viridans</i>
4406	<i>S. sanguis</i> I <i>S. suis</i> II	6153	<i>S. viridans</i>
4411	<i>S. epidermidis</i>	6157	<i>S. viridans</i>
4502	<i>S. suis</i> I	7453	<i>S. uberis</i>
4602	<i>S. suis</i> I	7473	<i>S. uberis</i>
4606	<i>S. pneumoniae</i>	7510	<i>S. durans</i>
4702	<i>S. suis</i> I	7512	<i>S. durans</i>
4706	<i>S. suis</i> II	7553	<i>E. faecalis</i> <i>S. uberis</i>
5000	<i>S. equinus</i>	7573	<i>S. uberis</i>
5004	<i>S. bovis</i> II <i>S. salivarius</i>	7772	<i>E. faecium</i>
5006	<i>S. bovis</i> II <i>S. salivarius</i>	7776	<i>E. casseliflavus</i>
5046	<i>S. bovis</i> I		

**QUALITY CONTROL**

Every batch of STREPTOSYSTEM 12R is subjected to the quality control using reference microbial strains:  
*Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC® 6303,  
*Enterococcus faecalis* ATCC® 19433, *Streptococcus agalactiae* ATCC® 13813.

**FACTORS THAT MAY INVALIDATE THE RESULTS**

Poor standardization of the inoculum; unsuitable clinical material; use of expired systems and/or reagents; non compliance with temperatures and times of incubation.

**CAUTIONS**

The product, STREPTOSYSTEM 12R, is classified as hazardous under current legislation, refer to the safety data sheet for a correct use. STREPTOSYSTEM 12R is a disposable device to be used only for diagnostic use *in vitro*. It must be used in the laboratory by properly trained personnel, using approved aseptic and safety methods for handling pathogenic agents.

**STORAGE**

Store at 2-8°C in the original packaging. Keep away from sources of heat and avoid excessive changes in temperature. In such conditions, the product will remain valid until the expiry date indicated on the label. Do not use beyond that date. Eliminate without using if there are signs of deterioration.

**DISPOSAL OF USED MATERIAL**

After use, STREPTOSYSTEM 12R and material that has come into contact with the sample must be decontaminated and disposed of in accordance with the techniques used in the laboratory for decontamination and disposal of potentially infected material.

**BIBLIOGRAPHY**

- Ronald M. Atlas. Handbook of Microbiological Media, 4th Edition (2010) CRC Press.
- Patrick R. Murray, Ellen Jo Baron, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller, and Robert H. Tenover. Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition (2003) ASM Press.
- Edwin H. Lennette. Manual of Clinical Microbiology, 4th Edition (1985) ASM Press.

**PRESENTATION**

Product	Ref.	Packaging
STREPTOSYSTEM 12R	72560	40 Test
STREPTOSYSTEM 12R	79560	8 Test

**TABLE OF SYMBOLS**

<b>IVD</b> <i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device	 Do not reuse	 Manufacturer	 Contains sufficient for <n> tests	 Temperature limitation
<b>REF</b> Catalogue number	 Fragile, handle with care	 Use by	 Caution, consult accompanying documents	<b>LOT</b> Batch code



## Anexo N°2: Documento de aprobación por parte del Comité de Ética.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Fundada por Ley 14013 del 13 de febrero de 1962

Comité de Ética

Av. Atahualpa 1050

Cajamarca, 21 de abril del 2021

Oficio N° 08-2021-CE-UNC

Bach. Vigo Lezma Celmira Medalith

ASUNTO: Informe de evaluación del Comité de Ética en Investigación del Proyecto presentado

PRESENTE

De nuestra consideración:

Es grato dirigimos a usted para saludarle cordialmente y el mismo tiempo manifestarle que el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Nacional de Cajamarca, en uso de sus atribuciones y de acuerdo a los establecido en el Código de Ética para la Investigación Científica de nuestra Superior Casa de Estudios, en sus capítulos III y IV, y art. del 7° y lo señalado en los acuerdos sobre ética en Investigación respectiva que rigen a nivel nacional, han revisado el proyecto de investigación, **Efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos acuosos y aceites esenciales de *Salvia macrophylla* L. (salvia) y *Kageneckia lanceolata* R. (Iloque) sobre *Streptococcus mutans*.**

Este comité luego de analizar los aspectos éticos de la investigación considera que cumple con las normas correspondientes en los capítulo IV y VI artículos 9° y 11° respecto de la investigación con personas y plantas, por lo tanto se opina por la procedencia de lo ejecutado, el mismo que queda registrado en el LIBRO del Comité con el código 005-2021.

Sin otro particular, es propicia la oportunidad para expresarle las muestras de nuestra consideración

Dra. Sara E. Palacios Sánchez  
Comité de Ética Investigación UNC  
UNC

Dr. Iván León Castro  
Comité de Ética Investigación  
UNC

Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares  
Comité de Ética de Investigación  
UNC

