



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
EUCALYPTUS GLOBULUS (EUCALIPTO) SOBRE EL STREPTOCOCCUS MUTANS
ATCC 25175. UN ESTUDIO IN VITRO

Línea de investigación:

Salud Pública

Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Autora:

Chamorro Palacios, María del Rosario

Asesor:

Chuna Espinoza, Jorge Dante

ORCID:0000-0002-0206-9779

Jurados:

Mendoza Murillo, Paul Orestes

García Rupaya, Carmen Rosa

Quispe Tasayco, Lucía Marisela

Lima-Perú

2023

Agradecimientos

Agradezco a Dios por ser mi guía en el transcurso de mi vida, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

A la Universidad Nacional Federico Villarreal y a todos los docentes por haber compartido sus conocimientos y por contribuir en mi desarrollo profesional.

A mi asesor Dr. Jorge Chuna por la voluntad, el tiempo y conocimientos brindado a mi persona.

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional en la realización de esta tesis.

Dedicatoria

Esta tesis lo dedico a mis padres por su amor, por su sacrificio, por enseñarme siempre a confiar en Dios y por apoyarme incondicionalmente a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida.

A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa, aportando a mi formación, tanto profesional y como ser humano.

Índice

Resumen

Abstract

I.	Introducción	1
	1.1. Descripción y formulación del problema.....	2
	1.2. Antecedentes	3
	1.3. Objetivos.....	10
	- Objetivo General.....	10
	- Objetivos Específicos	10
	1.4. Justificación	11
	1.5. Hipótesis	11
II.	Marco teórico	12
	2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación	12
III.	Método	22
	3.1. Tipo de investigación.....	22
	3.2. Ámbito temporal y espacial	22
	3.3. Variables	22
	3.4. Población y muestra.....	23
	3.5. Instrumentos	23
	3.6. Procedimientos.....	23
	3.7. Análisis de datos	26
IV.	Resultados	28
V.	Discusión de resultados.....	40
VI.	Conclusiones	42
VII.	Recomendaciones.....	43

VIII.	Referencias.....	44
IX.	Anexos	52

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Fue un estudio experimental, in vitro, comparativo y longitudinal; se trabajó en 10 placas con cuatro concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% del extracto etanólico de eucalipto y se comparó con el control positivo clorhexidina al 0.12% a las 24 y 48 horas. Para la detección de la eficacia antibacteriana se realizó mediante el método de Kirby Bauer y para el análisis estadístico se utilizó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni, mientras para la comparación entre tiempos se utilizó la prueba Wilcoxon y la prueba t de Student. Se obtuvo como resultado que a las 24 y 48 horas el extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó mayor halo inhibitorio (21.67 mm y 20.12 mm respectivamente), mientras que el extracto al 25% presentó el menor halo inhibitorio (12.92 mm y 11.53 mm respectivamente). Al comparar con la clorhexidina al 0.12% (17.50 mm y 17.04 mm respectivamente) el extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó un mayor halo inhibitorio, ($p < 0.05$). Concluimos que a las 24 y 48 horas se encontró que el extracto etanólico de eucalipto al 100% obtuvo mayor valor de media y significativo comparado a los otros grupos.

Palabras clave: efectividad antibacteriana, extracto etanólico, eucalipto, *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the in vitro antibacterial effectiveness of the ethanolic extract of *Eucalyptus globulus* (eucalyptus) on *Streptococcus mutans* ATCC 25175. It was an experimental, in vitro, comparative and longitudinal study; Work was carried out in 10 plates with four concentrations of 25%, 50%, 75% and 100% of the ethanolic extract of eucalyptus and it was compared with the positive control chlorhexidine at 0.12% at 24 and 48 hours. The Kirby Bauer method was used to detect antibacterial efficacy and the Bonferroni multiple comparison test was used for statistical analysis, while the Wilcoxon test and Student's t test were used for the comparison between times. It was obtained as a result that at 24 and 48 hours the 100% ethanolic extract of eucalyptus presented the highest inhibitory halo (21.67 mm and 20.12 mm respectively), while the 25% extract presented the lowest inhibitory halo (12.92 mm and 11.53 mm respectively). When compared with 0.12% chlorhexidine (17.50 mm and 17.04 mm respectively), the 100% ethanolic extract of eucalyptus presented a greater inhibitory halo ($p < 0.05$). We conclude that at 24 and 48 hours it was found that the 100% eucalyptus ethanolic extract obtained a higher mean and significant value compared to the other groups.

Keywords: antibacterial effectiveness, ethanolic extract, eucalyptus, *Streptococcus mutans*.

I. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la caries dental es una de las enfermedades más frecuentes, pues afecta a niños y adultos, por eso es muy importante la prevención y el tratamiento; ya que si lo detectamos a tiempo podemos detener su proceso.

Esta patología se da por diversas reacciones químicas y microbiológicas, que van dañando los tejidos duros del diente, avanzando hacia el interior y destruyendo la pieza dentaria; por lo cual, es una de las principales causas de la pérdida dental.

La caries es multifactorial, siendo unos de los factores principales: la acumulación de placa bacteriana, la dieta como el alto consumo de azúcares y los microorganismos como el *Streptococcus mutans*, los *Lactobacillus* y los *Actinomyces*.

Las bacterias cariogénicas son capaces de transformar los carbohidratos de los alimentos en ácidos y estos producen una desmineralización progresiva de los dientes que van destruyendo los tejidos, produciendo la caries dental.

El *Streptococcus mutans* es la principal bacteria responsable de la generación de caries, siendo partícipe de la colonización principal del biofilm que rodea a los dientes; si hay un desequilibrio por diversos factores, entonces el *Streptococcus mutans* metabolizará diversos azúcares, formando una fuerte biopelícula y produciendo abundante cantidad de ácido láctico, el cual destruirá el esmalte dental.

La forma más eficaz de combatir la caries es previniendo su aparición, con una higiene bucal completa, una dieta saludable y chequeos preventivos.

Actualmente se conoce la utilización de medicinas naturales para el tratamiento de algunas enfermedades como la caries. El uso y el mecanismo de acción de extractos etanólicos que impidan el desarrollo del *Streptococcus mutans* en el biofilm dental está siendo investigado. Tal es el caso del eucalipto, el cual posee componentes con efectos bacteriostáticos; asimismo, inhiben la adherencia de placa bacteriana.

1.1. Descripción y formulación del problema

La caries dental es una enfermedad infecciosa, probablemente más prevalente, está mediada por biopelículas e impulsada por azúcares que da como resultado la desmineralización y remineralización de los tejidos del diente. La caries puede ocurrir a lo largo de la vida, tanto en la dentición temporal como en la permanente y puede dañar la corona del diente produciendo su pérdida. La relación entre los factores patológicos y defensores influye en el comienzo y progresión de la caries. (Pitts et al., 2017)

En la patogénesis de la caries dental participan diversos microorganismos, dentro los más comunes tenemos: a los *Streptococos* del grupo *mutans*, los *Lactobacillus spp* y los *Actinomyces spp*; siendo el *Streptococcus mutans* el microorganismo principal causante. (Escribano et al., 2005)

La placa bacteriana dental es una película incolora y pegajosa formada por el metabolismo de azúcares, se genera y deposita en las superficies de los dientes, la cual crea un hábitat natural con todas sus funciones, interacciones y propiedades para el *Streptococcus mutans*. Esta bacteria se adapta sintetizando glucanos, fijando compuestos y se adapta a su aciduricidad. Por eso, el *Streptococcus mutans* ha evolucionado para que su desarrollo, sobrevivencia y persistencia en la cavidad oral dependa de su crecimiento en biopelícula y de la densidad celular que alcance en ella. (Ojeda et al., 2013)

Varios países han reconocido el aporte de la medicina tradicional al sistema de salud y el bienestar de las personas. Incluso la Organización Mundial de la Salud viene iniciando la utilización adecuada de los sistemas tradicionales de medicina con el objetivo de instaurar con base científica el uso de la medicina natural. (OMS, 2013).

Los productos antibacterianos y antisépticos pueden ser hechos a base de plantas medicinales como el eucalipto, que contiene eucaliptina, la cual posee efectos bacteriostáticos; además del cineol y la carvona, que son altamente antisépticos. Hay estudios que han

demostrado que sus componentes principales poseen un amplio espectro de actividad antibacteriana (Fonnegra y Jiménez, 2007; Gachkar et al., 2007).

La presencia de compuestos fenólicos y taninos en el extracto etanólico de eucalipto, podría ser la razón principal de la actividad antibacteriana y estar relacionado con su capacidad para unirse a proteínas y destruir la pared celular de las bacterias. (Seyyednejad et al., 2014)

La clorhexidina es un colutorio bucal antiséptico más empleado y efectivo debido a sus efectos antimicrobianos, ya que ayuda controlar la placa dental y reducir los síntomas clínicos de gingivitis y alveolitis seca; así también, reducir el desarrollo bacteriano. Sin embargo, posee efectos menos deseables como la tinción extrínseca de los dientes, la resistencia antimicrobiana a los agentes antisépticos y las reacciones alérgicas raras pero fatales a la clorhexidina. (Cieplik et al., 2019)

Debido a las propiedades antibacterianas que posee el extracto etanólico de eucalipto, se propone su uso como alternativa de tratamiento natural, económico y accesible, frente a fármacos convencionales en la prevención de las enfermedades bucales. Por ello, surge la siguiente interrogante:

¿Cuál es la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en un estudio in vitro?

1.2. Antecedentes

Abad (2019) desarrolló una investigación en Ecuador, con el objetivo de determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de eucalipto a diferentes concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % en un tiempo determinado de 12, 24, 48 y 72 horas frente a las cepas bacterianas del *Streptococcus mutans* y la *Porphyromonas gingivalis*. Fue un estudio in vitro, experimental y comparativo en donde se utilizó el método de difusión en agar Kirby-Bauer. El aceite esencial de *Eucalyptus globulus* se obtuvo a través de arrastre por vapor, se utilizaron un total de 22 cajas Petri esterilizadas, contenidas de agar Müller- Hinton, donde se sembraron las cepas de

Streptococcus mutans y *Porphyromonas gingivalis*, luego de la inoculación se procedió a colocar cuatro discos de papel filtro impregnados con 20 ml de aceite esencial de *Eucalyptus globulus* en diferentes concentraciones; como control positivo se utilizó clorhexidina al 2 % (Gold estándar) y como control negativo, agua estéril. Se analizaron los resultados transcurridos 12, 24, 48 y 72 horas para luego proceder a realizar un análisis estadístico ANOVA, tablas descriptivas T student. Como resultado se obtuvo que a las 24 y 48 horas las concentraciones de aceite esencial de Eucalipto de 75 % y 100 % tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre el *Streptococcus mutans*, mientras que sobre la cepa de *Porphyromonas gingivalis* la concentración al 100 % en 24 horas resultó ser la más efectiva. Se concluyó que el aceite esencial fue más eficaz sobre el *Streptococcus mutans* que sobre *Porphyromonas gingivalis* en algunas concentraciones, llegando a superar la media de la clorhexidina (Gold estándar).

Espín (2019) desarrolló un estudio en Ecuador, con el objetivo de comparar el efecto inhibitorio del aceite esencial de eucalipto con el aceite esencial de clavo de olor, sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC (American Type Culture Collection) 25175. Fue un estudio in vitro, experimental y comparativo, en donde se inoculó el microorganismo en 12 cajas Petri con Agar Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre, en las 6 cajas se colocó cinco discos de papel impregnados del aceite esencial de eucalipto a concentraciones de 50, 75 y 100%, la azitromicina como control positivo y como control negativo, agua destilada; en las otras 6 cajas con el aceite esencial de clavo de olor a concentraciones de 50, 75 y 100%, la azitromicina como control positivo y como control negativo el agua destilada; se llevó a incubación en campana de anaerobios a una temperatura de 37°C por 24 horas y posteriormente se midió el halo de inhibición producido. Los resultados fueron que el aceite de eucalipto tuvo efecto inhibitorio con tendencia a “muy sensible”, mientras que el clavo de olor presentó la tendencia de “muy sensible” a “sumamente sensible”. Se concluyó que el efecto inhibitorio del aceite de

clavo de olor es mayor al efecto del aceite de eucalipto, creando un efecto antimicrobiano elevado hacia la cepa *Streptococcus mutans*.

Ragul et al. (2018) publicaron una investigación en la India, con el objetivo de comparar el efecto terapéutico de los colutorios de clorhexidina y aceite de eucalipto en el mantenimiento de la higiene bucal. Fue un estudio experimental y comparativo, donde un total de 74 sujetos humanos seleccionados fueron asignados al azar en dos grupos, Grupo I y Grupo II. A los sujetos del Grupo I se les indicó que usaran 10 ml de enjuague bucal con clorhexidina durante 14 días y al Grupo II se les indicó que usaran un enjuague bucal con aceite de eucalipto durante 14 días dos veces al día. El estado de higiene oral se evaluó midiendo la placa y las puntuaciones gingivales. La formación de placa se evaluó usando el agente revelador eritrosina, y el índice gingival se calculó usando el índice de Silness y Loe al inicio y a los 14 días. En los resultados se observó una disminución del nivel de placa en ambos enjuagues bucales sin ningún efecto adverso. Las puntuaciones del índice de placa y del índice gingival para el Grupo I y el Grupo II después de 14 días fueron $1,012 \pm 0,25$, $1,008 \pm 0,27$ y $1,254 \pm 0,58$, $1,233 \pm 0,72$ respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los enjuagues bucales de clorhexidina y eucalipto ($P > 0,05$). Se concluyó que una alternativa eficaz a la clorhexidina es el aceite de eucalipto, se puede utilizar como enjuague bucal para un mantenimiento eficaz de la higiene bucal. Los presentes resultados, por lo tanto, ofrecen una base científica para el uso tradicional y el conocimiento del enjuague bucal con el aceite de eucalipto.

Spoorthi et al. (2017) ejecutaron una investigación en Malasia, con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de los bulbos de ajo, hojas de menta, hojas de mango y hojas de eucalipto sobre el *Streptococcus mutans*. Fue un estudio in vitro, experimental y comparativo, en donde se realizó análisis microbiológicos (método de difusión en pozo) para determinar la zona de inhibición contra formas puras de *Streptococcus*

mutans. Se estudiaron los efectos antibacterianos de los extractos metanólicos de las hojas de mango, hojas de eucalipto, hojas de menta y bulbos de ajo. Como resultados se obtuvo que los extractos derivados de las ramas de eucalipto y del mango mostraron importantes efectos antibacterianos en las concentraciones de ensayo, mientras los extractos de menta y ajo no mostraron efectos significativos antibacterianos en concentraciones similares.

Coswig et al. (2014) publicaron una investigación en Brasil, con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de dos especies de eucalipto *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus urograndis* contra las células planctónicas y del biofilm de *Streptococcus mutans*. Fue un estudio in vitro y experimental, en donde utilizando el ensayo de difusión en agar y determinando las concentraciones inhibitoras mínimas, la cinética de acción y la capacidad para inhibir la formación de biopelículas; también se probó el efecto sinérgico de los aceites combinados (1:1). Se prepararon películas construidas de almidón biodegradable con los aceites esenciales y se probó su bioactividad mediante la técnica de macrodilución. Los resultados fueron que los aceites probados mostraron bioactividad contra *Streptococcus mutans*. En el ensayo de difusión en agar, se observaron zonas de inhibición de $14,7 \pm 1,2$ mm diámetro para el *Eucalyptus urograndis* y $35,3 \pm 0,3$ mm de diámetro para *Eucalyptus globulus*. Se concluyó que los aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus urograndis* son potenciales anticariogénicos que inhiben el biofilm y las células planctónicas del *Streptococcus mutans*. Sin embargo, el *Eucalyptus globulus* mostró los mejores resultados.

Chaudhari et al. (2012) ejecutaron un estudio en la India, con el objetivo de estudiar la actividad antibacteriana de nueve aceites esenciales comercialmente disponibles contra *Streptococcus mutans* y comparar la actividad antibacteriana entre cada material. Fue un estudio in vitro, experimental y comparativo, en donde se seleccionaron para el estudio los siguientes aceites: aceite de gaulteria, aceite de lima, aceite de canela, aceite de menta verde,

aceite de menta piperita, aceite de limoncillo, aceite de cedro, aceite de clavo y aceite de eucalipto; el *Streptococcus mutans* se inoculó a 37 ° C y se sembró en medio de agar sangre; el ensayo de difusión en pozos de agar se usó para medir la actividad antibacteriana, la zona de inhibición se midió alrededor del papel de filtro en milímetros con un calibre vernier. Como resultados se obtuvo que el aceite de canela mostró la mayor actividad contra *Streptococcus mutans*, seguido del aceite de limoncillo y el aceite de cedro. El aceite de gaulteria, el aceite de lima, el aceite de menta piperita y el de menta verde no mostraron actividad antibacteriana. Se concluyó que los aceites de canela, limoncillo, cedro, clavo y eucalipto tienen propiedades antibacterianas contra el *Streptococcus mutans*.

Carranza (2020) desarrolló una investigación en Perú, con el objetivo de evaluar el efecto sinérgico de la combinación de extractos de *Plantago major* (llantén), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en la inhibición del crecimiento de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Fue un estudio experimental, in vitro, prospectivo y longitudinal. El universo estuvo formado por las cepas *Streptococcus mutans*, y la población las cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). El tamaño de la muestra se basó en el método estandarizado del CLSI. La muestra fueron 10 discos por extracto, embebidos con 50 uL., colocados sobre agar Mueller Hinton con sembrado de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), se realizó las medidas de los halos de inhibición a las 24 horas. Se usaron pruebas paramétricas de análisis de varianza y la prueba Tukey. Como resultado el halo inhibitorio promedio de la clorhexidina al 0.12% fue de 12,76 mm (p= 0,006). El extracto de “eucalipto” al 25% presentó diferencias significativas respecto a los otros grupos (p=0,040), al 50% (p=0,002) y al 100% (p=0,000). Se concluyó que el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* al 100% presentó efecto inhibitorio frente a *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) in vitro.

Landeo (2018) ejecutó una investigación en Perú, con el objetivo de evaluar la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de *Mentha spicata* (hierba buena) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto) de origen comercial sobre el desarrollo de biopelículas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en un modelo in vitro. Fue un estudio experimental y comparativo, en donde se evaluó la composición de los aceites esenciales por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrómetro de Masas (CG/EM) siendo los principales metabolitos el R-(-)-carvona (57,93%) y limoneno (12,907%) para *Mentha spicata* y el 1,8-cineol (eucaliptol) (65,83%) para *Eucalyptus globulus*, también evaluó la actividad inhibitoria de los aceites esenciales por los métodos de difusión en pozo de agar y microdilución colorimétrica. Como resultados se obtuvo que los halos de inhibición fueron de $18,3 \pm 0,47$ mm y $27,0 \pm 0,82$ mm para los aceites esenciales de *Mentha spicata* y *Eucalyptus globulus* respectivamente. Se concluyó que los efectos de ambos aceites esenciales no resultaron significativamente distintos entre sí y que ambos aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* en cultivos planctónicos y de biopelícula, por lo que podría tener gran potencial para el desarrollo de productos farmacéuticos y sanitarios en el área de la salud oral.

Cahuana y Condóri (2017) realizaron un estudio en Perú, con el objetivo de determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico del *Eucalyptus globulus* sobre la bacteria *Streptococcus mutans* y el hongo *Candida albicans*. Fue un estudio in vitro, experimental y comparativo, en donde se utilizó la técnica de cultivo propuesta por el Instituto Nacional de Salud y para la detección del efecto inhibidor a través de la prueba de difusión de pocillos con disco de papel filtro combinado y por el método de Kirby Bauer. Como resultados se obtuvo que el extracto etanólico *Eucalyptus globulus* tiene actividad inhibitorio para la bacteria *Streptococcus mutans* con un promedio de halo de inhibición 11.85 mm para una concentración del 25%, 13.3 mm para una concentración del 50%, 13.97 mm para una concentración del 75% y 15.54 mm para una concentración del 100%, la actividad antifúngica para *Candida albicans*

se dio con un promedio de 9.34 mm para una concentración del 25%, 10.41 mm para una concentración del 50%, 11.39 mm para una concentración del 75% y 12.45 mm para una concentración del 100%, lo que demuestra que a mayor halo inhibitorio se da a mayor concentración, siendo directamente proporcional. Se concluyó que el extracto etanólico del *Eucalyptus Globulus* presenta efecto inhibitorio sobre la cepa de la bacteria *Streptococcus mutans* y en el hongo *Cándida albicans*, de modo que puede ser usado como un agente en el control de la caries dental y candidiasis oral.

Vela (2017) desarrolló un estudio en Perú, con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de eucalipto en comparación con el efecto del gluconato de clorhexidina al 2% sobre la cepa ATCC 25175 de *Streptococcus mutans*. Fue un estudio in vitro, experimental y comparativo, en donde se determinó la susceptibilidad bacteriana mediante la técnica por difusión en discos, embebidos en concentraciones al 50%, 75% y 100% del extracto etanólico de eucalipto, gluconato de clorhexidina al 2% y en agua destilada. Se incubaron a 37°C en microanaerobiosis, midiéndose los halos con un vernier después de 24 horas. Como resultados se obtuvo que las 10 repeticiones con las concentraciones del extracto etanólico de eucalipto al 50%, 75% y 100% presentaron sensibilidad media; mientras que de las 10 repeticiones con gluconato de clorhexidina al 2%, 4 presentaron sensibilidad media y 6 sensibilidad alta en la inhibición de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. El promedio de los halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* con extracto etanólico de eucalipto al 50% fue de 16.7 mm, con extracto etanólico de eucalipto al 75% fue de 18.0 mm, con extracto etanólico de eucalipto al 100% fue de 19.1 mm, con gluconato de clorhexidina al 2% fue de 20.3 mm y con agua destilada fue de 0 mm. Se concluyó que el extracto etanólico de eucalipto y el gluconato de clorhexidina al 2% tuvieron efecto antibacteriano semejante sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Evaluar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar in vitro el diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 horas.

- Determinar in vitro el diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 48 horas.

- Determinar in vitro el diámetro del halo inhibitorio de la clorhexidina al 0.12% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 horas.

- Determinar in vitro el diámetro del halo inhibitorio de la clorhexidina al 0.12% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 48 horas.

- Comparar el promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% y la clorhexidina al 0.12% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 horas.

- Comparar el promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% y la clorhexidina al 0.12% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 48 horas.

1.4. Justificación

La caries dental se ha convertido en un problema bucal muy común que afecta tanto a niños como adultos y el Perú es uno de los países con el índice más alto. El *Streptococcus mutans* es el principal responsable de la iniciación de esta enfermedad, por lo que se buscan sustancias que inhiban su crecimiento.

En la actualidad los productos de higiene bucal contienen muchos químicos que pueden tener efectos adversos, como reacciones de hipersensibilidad inmediata, toxicidad y tinción de los dientes; por esa razón, se buscan alternativas con productos a base de plantas medicinales con propiedades antibacterianas, como el eucalipto.

Por ello, de acuerdo con lo descrito, el propósito del presente estudio es determinar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, con el fin de que pueda ser usado como agente preventivo para controlar esta bacteria y disminuir la caries dental en nuestro medio; además, por ser de fácil acceso, de bajo costo y un recurso abundante en nuestro país. También podría establecerse como base para una futura elaboración de un producto aplicable y beneficioso en la práctica odontológica.

1.5. Hipótesis

Dado que el extracto etanólico del *Eucalyptus globulus* presenta propiedades antibacterianas; es probable que tengan efectividad inhibitoria sobre la formación del *Streptococcus mutans* cepa ATCC 25175.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. *Eucalyptus globulus* (Eucalipto)

Es una de las especies de eucalipto más conocido y plantado, es muy fácil de adaptarse y de rápido crecimiento, también resiste fuertes vientos y climas muy fríos. Es una planta de gran tamaño y forma, tiene un característico follaje de color plata, es fácil de reconocer por el fuerte olor a alcanfor que desprenden las hojas al estrujarlas. (Becerra, 2010)

El eucalipto es originario de Australia y fue introducido a la sierra del Perú en la década de 1860-1870, principalmente en los valles interandinos, la especie se aclimató velozmente a las condiciones geográficas y ambientales de la sierra, costa y también la selva alta. Los campesinos y la población de las ciudades se benefician directa o indirectamente. (Tarte, 1986).

2.1.1.1. Clasificación. Es perteneciente al dominio: *Eucariota*, reino: *Plantae*, división: *Magnoliophyta*, clase: *Magnoliopsida*, subclase: *Rosidae*, orden: *Myrtales*, familia: *Myrtaceae*, subfamilia: *Myrtoideae*, tribu: *Eucalypteae*, género: *Eucalyptus* y especie: *Globulus*. (Liu et al., 2002)

2.1.1.2. Características botánicas. El árbol de eucalipto es de gran tamaño, maderero y a su vez medicinal, alcanza a crecer hasta los 60 metros. Posee un tronco cilíndrico, recto, de un grosor que puede alcanzar hasta 2 metros de diámetro; tiene una copa irregular y alargada en forma de cono; su corteza principal es de aproximadamente 3 cm. de espesor cuando está maduro, dejando una segunda corteza lisa; sus hojas jóvenes tienen un color particular gris-azulado, con crecimiento en sentido opuesto, abrazando al tallo; mientras las hojas adultas tienen un color verdoso, pudiendo llegar a crecer 20 cm de largo aproximadamente, además toman una forma cuneada y crecen en grupos de 3 a 4 hojas; su estambre es de color blanco y su fruto está encapsulado en forma de campana cubierta de un polvo blanquecino y sus semillas

fértiles son de color negro, rugosas y más grandes, mientras los óvulos sin fertilizar, tienen un color rojizo y son más livianos (Tarte, 1986).

2.1.1.3. Composición. Las hojas de eucalipto contienen de 3 a 5% de aceite esencial; el primordial componente es el cineol, también llamado eucaliptol y se presenta en un 75% a 85% en el aceite esencial; asimismo posee terpenos y alcoholes como el pineno, canfeno, terpinol y eugenol; además de aldehídos y cetonas. Aparte del aceite esencial, el eucalipto contiene ácidos como el polifenólico, elágico, álico, flavonoides (eucaliptina), taninos (sustancias detoxificantes) y resinas. (Osawa et al., 1995)

2.1.1.4. Propiedades. El eucalipto tiene propiedades comprobadas científicamente, el aceite esencial es usado como antitúxico, expectorante y antiséptico, la eucaliptina tiene efectos bacteriostáticos, el cineol y la carvona son altamente antisépticos. (Fonnegra y Jiménez, 2007)

En el extracto de hoja de eucalipto se encontró componentes activos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiinflamatorios y antihelmínticos. Dentro de estos componentes activos están el ácido fenólico, flavonoides y taninos. (Ullah et al., 2021)

Los aceites esenciales de eucalipto son indicados para realizar inhalaciones que, gracias a su acción, eliminan e interrumpen el crecimiento de microorganismos perjudiciales para nuestro aparato respiratorio; también se utiliza como fungicida, característica que le permite ser administrado como antiséptico en zonas con escasos recursos para operaciones de desinfección, especialmente ambiental, para combatir la propagación por el aire de enfermedades como el cólera. (Montoya, 1995)

Es usado frecuentemente para despejar las vías respiratorias, ya que es un magnífico expectorante con capacidad contra la inflamación, esta propiedad le otorga una gran ventaja para tratamientos contra la bronquitis, gripe, faringitis, rinitis, sinusitis, asma (Damjanović et al., 2011)

Usado también en el tratamiento de la piel, reduciendo las manchas, forúnculos y granos; asimismo, mejora la circulación sanguínea, pero con aplicaciones de dosis pequeñas, ya que si se aplica en altas proporciones puede irritar en la zona a tratar. (Damjanović et al., 2011).

En odontología, el eucaliptol y el aceite de naranja han desarrollado una actividad solvente de la gutapercha tan eficaz en cuanto al xilol y el halotano; además la sustancia extraída de las hojas de eucalipto llamada eucaliptona, es considerado como un nuevo agente cariostático. (Oyama et al., 2002; Osawa et al., 1995)

2.1.1.5. Mecanismo de Acción. La actividad bactericida del eucalipto se debe a sus compuestos fenólicos y monoterpenos, debido a que son capaces de tener una interacción inmediata con el citoplasma del patógeno y gracias a su hidrofobicidad pueden unirse a los lípidos de la membrana celular bacteriana, en donde ocurre una salida de iones y demás compuestos de la bacteria. Esta actividad antimicrobiana está relacionada con su composición y efectos citotóxicos, que producen daño a la membrana celular y como resultado causa la lisis bacteriana. (Montero et al., 2019)

En general, el efecto antimicrobiano se debe principalmente a la presencia de fenoles como los taninos y flavonoides; además de los aldehídos y alcoholes. (Reyes et al., 2014)

Los compuestos fenólicos presentes en el eucalipto podrían estar relacionado con su capacidad para unirse e inhibir la síntesis de proteínas de la pared celular de la bacteria, produciendo una alta actividad antimicrobiana. (Seyyednejad et al., 2014)

Actualmente, una de las plantas más utilizadas como medicina natural en los Andes peruanos es el eucalipto; fundamentalmente es empelado para tratar las afecciones respiratorias como la faringitis y la laringitis, las cuales se encuentran entre las cinco complicaciones de salud más frecuentes en las provincias de Huaraz y Carhuaz, entre otras. (Brescia, 2022)

2.1.1.6. Contraindicaciones y toxicidad. El aceite esencial de eucalipto está contraindicado en pacientes que sufren inflamación gastrointestinal, de las vías biliares o insuficiencia hepática (Fonnegra y Jiménez, 2007). También puede provocar síntomas tóxicos en forma de ataque, taquicardia, somnolencia, entre otros. Esto puede deberse por la presencia del eucaliptol, componente presente en el aceite esencial de eucalipto. (Bermúdez et al., 2007)

Sin embargo, hay estudios que demostraron que el extracto de eucalipto a ciertas dosis no presenta toxicidad. Bermúdez et al. (2007) evaluaron la toxicidad en ratas empleando una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal, en el cual no se evidenció ningún síntoma ni signo de toxicidad.

Ajilore et al. (2021) evaluaron la toxicidad del extracto metanólico de hojas de *Eucalyptus globulus* sobre ratas, en el cual a una dosis de 300 mg/kg de peso corporal no mostraron toxicidad en ninguna de las ratas que recibieron la dosis durante el período de 14 días.

Berhan et al. (2020) evaluaron la toxicidad del aceite esencial de eucalipto en ratones y ratas, donde no se mostró ningún efecto en los ratones a una dosis de 1500 mg/kg o menos, pero causó signos de toxicidad y muerte a una dosis de 1750 mg/kg o más.

Lozano et al. (2017) evaluaron la toxicidad aguda de tres enjuagues bucales a base de llantén, uña de gato y eucalipto sobre el camarón salino, donde se determinó poca toxicidad de estas plantas en el camarón salino, con base a los índices de toxicidad de Meyer y de Clarkson, lo que demuestra que se podrían usar los tres enjuagues bucales, pero con cautela.

2.1.2. La clorhexidina

La clorhexidina es una bisbiguanida que se desarrolló en la década de 1940 en el Reino Unido y se ha comercializado como desinfectante general. En la década de 1970 se descubrió su actividad antiplaca y en 1976 estaba disponible como enjuague bucal. (Raszewski et al., 2019)

Los nombres de las sales de clorhexidina se simplifican a: clorhidrato, acetato o gluconato de clorhexidina. La clorhexidina también existe en forma de otra sal: el fosfonato. (Lukomska et al., 2017)

2.1.2.1. Mecanismo de acción. Comienza cuando la clorhexidina cargada positivamente es atraída por la carga negativa en la pared celular bacteriana. La clorhexidina forma una adsorción fuerte y específica a las moléculas que contienen fosfato encontradas en la superficie de la célula bacteriana. La penetración se origina a través de la pared celular bacteriana, como resultado de la difusión pasiva, atrayendo hacia la membrana citoplasmática de la célula, dañándola y comprometiendo su integridad. Este evento permite que la clorhexidina se infiltre en la membrana celular interna, dando resultado una mayor permeabilidad, provocando una salida de moléculas de bajo peso molecular y componentes citoplasmáticos que escapan del microorganismo, como los iones de potasio; llevando a la inhibición de la actividad de algunas de las enzimas asociadas con la membrana citoplasmática. En este punto, la acción antimicrobiana de la clorhexidina permanece en la etapa bacteriostática, pero puede revertirse si se elimina la clorhexidina. Sin embargo, si la concentración de la clorhexidina se mantiene estable en el tiempo o aumenta, se producirá un daño celular irreversible y una etapa bactericida. En la etapa bactericida, la coagulación y la precipitación citoplasmática se producen mediante la formación de complejos con compuestos fosforilados, como el trifosfato de adenosina (ATP) y los ácidos nucleicos. (Poppolo y Ouanounou, 2022).

La clorhexidina se ha utilizado para controlar la caries dental causada por bacterias tolerantes a los ácidos como *Streptococcus mutans* desde la década de 1970. La exposición repetida a la clorhexidina para otras especies bacterianas da como resultado el desarrollo de variantes con susceptibilidad reducida que también se vuelven más resistentes a otros antimicrobianos. (Kaspar et al., 2019)

2.1.3. La Caries

La caries constituye un proceso patológico, caracterizado por la pérdida de minerales que esta mediada por la acción metabólica del biofilm adherido a las zonas del diente y cuando ocurre, se produce una serie de cambios en la superficie del esmalte que permite su detección clínica y radiográfica. Estas lesiones cariosas pueden manifestarse desde pequeñas pérdidas de mineral o destrucción total del esmalte, dentina o el cemento. (Moncada y Urzúa, 2008)

La caries dental es un proceso complejo de causa contagiosa y traspasable, que dañan las estructuras de las piezas dentarias, también afectan en el proceso de la alimentación y la nutrición; asimismo, altera la forma psicológica como social de quienes lo padecen. (Barreiro y Zambrano, 2021)

2.1.3.1. Factores de la Caries. La etiopatogenia de la caries dental se debe a la interacción de tres factores principales: huésped, microorganismo y sustrato. Cuando estos factores se presentan paralelamente, hace que la caries se manifieste, si uno sólo de los componentes faltase, la caries no se desarrollaría y si ésta ya existiese, se detendría. Este conjunto de agentes es conocido como Tríada Etiológica de Keyes. (Keyes, 1962)

Para la iniciación de la caries dental es necesaria la interacción de tres factores primarios: el tejido huésped en el que se encuentra la morfología del diente con superficie propicia para la retención de placa y la saliva la cual es el medio oral; el segundo factor es la microflora bucal en la que se encuentra bacterias con potencial poder cariogénico y colonizan la boca produciendo sustancias químicas que pueden destruir el esmalte y la dentina; el tercer factor es el sustrato local que se da con la ingesta frecuente de azúcares y más si es pegajosa o viscosa proporciona los requisitos nutricionales y energéticos para la microflora. (Villafranca et al., 2005).

Estas interacciones de factores modulan la transición de una condición saludable a un estado de enfermedad, como la caries dental, que se caracteriza por el establecimiento de

biopelículas cariogénicas en la superficie del diente susceptible y muchas veces conduce a la cavitación a través de la disolución ácida del esmalte. (Bowen y Koo, 2011)

Los microorganismos principales relacionados a esta enfermedad de la caries son aquella que participan en el desarrollo inicial de la enfermedad, como el *Streptococcus mutans* que está relacionado con la biopelícula de la placa cariogénica y asociada a su comienzo; además, en la saliva hay un aumento de estos microorganismos antes de la formación de la caries y los que participan en la progresión de lesiones establecidas, aquí se encuentran los *Lactobacilos*, *Actinomyces* y otros microorganismos capaces de sobrevivir y proliferar en medio ácido. (Negroni, 2009)

Las dos especies de estreptococos más comúnmente aislados de muestras de dientes son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Siendo más cariogénico el *Streptococcus mutans*; debido a que las proteínas específicas de su superficie celular ayuda en su unión primaria al diente, mientras que el *Streptococcus sobrinus* carece de tales proteínas. (Coykendall, 1989)

2.1.4. *Streptococcus Mutans*

El *Streptococcus mutans* es un microorganismo gram positivo identificado por Clarke en 1924 a partir de lesiones cariosas en personas. Es una bacteria anaerobia facultativa, ya que puede crecer en presencia de oxígeno y también puede sobrevivir en ausencia de oxígeno; sin embargo, su crecimiento óptimo sucede en anaerobiosis. Se denominó *Streptococcus mutans* porque presenta formas mutantes: en un medio ácido presenta forma ovalada y en un medio alcalino se presenta en forma de coco o redondeada. El *Streptococcus mutans* en los niños se adquiere y se transmite a través de la saliva de las madres y la presencia permanente de estos microorganismos empieza con la erupción de los primeros dientes en la cavidad oral; ya que requiere la presencia de tejido duro no descamativo para su colonización. (Gutiérrez, 2006)

El *Streptococcus mutans* al ser un anaerobio facultativo puede sobrevivir en cualquier lugar de la cavidad oral y también puede fermentar la mayoría de los azúcares y alcoholes presentes en los alimentos como glucosa, sacarosa, lactosa, manitol, sorbitol, etc. (Okada et al., 2005)

2.1.4.1. Factores de virulencia. Los factores de virulencia cariogénicos de *Streptococcus mutans* conducen a una abundante producción de ácido, tolerancia al ácido y formación estable de biopelículas. (Banas, 2004)

En los principales factores de virulencia del *Streptococcus mutans* están: su capacidad para producir ácidos orgánicos a través del metabolismo de los carbohidratos de la dieta (acidogeneidad) y para resistir sobreviviendo en un entorno de pH ácido. (Beighton, 2005; Zhu et al., 2017)

El *Streptococcus mutans* presenta una serie de factores cariogénicos: tiene poder acidógeno porque producen ácidos; poder acidófilo porque son muy tolerantes en el medio de pH ácido; poder acidúrico porque siguen produciendo ácidos en un medio de pH ácido; tiene rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y a otros ácidos orgánicos; pueden conseguir el pH crítico causando la desmineralización del esmalte más rápido que cualquier otro microorganismo; producen polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa; por último, produce y moviliza los polisacáridos intracelulares. (Liébana, 2002)

A. Producción de polisacáridos extracelulares. La síntesis de polisacáridos extracelulares se da a través de las enzimas glucosiltransferasas adsorbidos en la superficie, estas enzimas sintetizan glucanos complejos a partir de la sacarosa de la dieta *in situ*, que son críticos para la acumulación de bacterias en la superficie del diente y contribuyen a la integridad estructural y voluminosa de las biopelículas. (Schilling y Bowen, 1992)

El *Streptococcus mutans* metaboliza la sacarosa para sintetizar glucanos solubles y/o insolubles en agua. Las reacciones son catalizadas por tres isoenzimas de glucosiltransferasas (GTF); es decir, GTF-B, GTF-C y GTF-D. (Monchois et al., 1999)

El glucano tiene una característica pegajosa facilitando la adherencia de las bacterias al diente y resistiendo su desprendimiento por fuerzas mecánicas normales, como la masticación y la deglución. Además, el *Streptococcus mutans* produce tres proteínas de unión a glucano (Gbps), GbpA, GbpB y GbpC; ha sido probado que estas proteínas tienen un papel importante en la mediación de la adherencia dependiente de la sacarosa. (Matsumura et al., 2003)

B. Aciduricidad, acidogenicidad y acidofilicidad. El *Streptococcus mutans* tiene la capacidad de producir rápidamente grandes cantidades de ácido (acidogenicidad), tolerar la exposición a ambientes de pH ácido (acidofilicidad) y producir ácido en un ambiente ya ácido (aciduricidad). En comparación con otras bacterias probadas, in vitro, los *streptococos mutans* generalmente son capaces de producir ácido más rápidamente, para producir la mayor cantidad cuando se exponen a un entorno de pH bajo y para sobrevivir a la exposición a condiciones ácidas (de Soet et al., 2000; Köhler et al., 1995)

Se observó una disminución considerable del pH de 7,0 en la cavidad bucal unos minutos después de un enjuague con glucosa. Esto implica que la bacteria es rápidamente acidogénica. Esto está mediado por un sistema de fosfotransferasa altamente eficiente para la glucosa y la sacarosa. (Kleinberg, 2002; Nascimento et al., 2004)

C. Síntesis de polisacáridos intracelulares. El *Streptococcus mutans* sintetiza polisacáridos intracelulares (IPS) similares al glucógeno, en presencia de glucosa extracelular y sacarosa. Estos IPS son homopolímeros de glucosa con enlaces α (1-4) y α (1-6). El metabolismo de IPS puede favorecer el desarrollo de caries al prolongar el tiempo de exposición a los ácidos orgánicos cuando la bacteria está desprovista de una fuente externa de alimento. (van Houte et al., 1970)

Si hay exceso de azúcar disponible, además de producir ácidos orgánicos y matriz, se forma polisacárido intracelular. El IPS de *Streptococcus mutans* es un polímero del tipo glucógeno-amilopectina, con glucosa unida a α -(1, 4) y α -(1, 6), y se almacena en forma de gránulos intracelulares. El IPS se puede utilizar como fuente de carbohidratos para la fermentación al agotarse los nutrientes. La utilización de IPS puede prolongar la producción de ácido y, por lo tanto, aumenta el período de disminución del pH de la placa en reposo (entre comidas), lo cual es un factor que contribuye a la incidencia de caries. (Busuioc et al., 2009)

Numerosos informes confirman a los polisacáridos intracelulares como contribuyente importante a la cariogenicidad de *Streptococcus mutans*. (Harris et al., 1992)

D. Síntesis de glucanos y fructanos. A partir de la sacarosa actuarán enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), las cuales originan como producto los polímeros glucano y fructano. Estos glucanos insolubles consiguen ayudar a la célula a adherirse al diente y ser utilizado como reserva de nutrientes. (Duque et al., 2006)

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Experimental in vitro, prospectivo, longitudinal y analítico.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El extracto etanólico de eucalipto y los cultivos para la prueba de sensibilidad fueron realizados en Lima, Perú; en el Centro Control Analítico de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. (Anexo A)

3.3. Variables

Variable Independiente

- El extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto).

Variable Dependiente

- Efecto antibacteriano.

Grupo de control positivo

- Clorhexidina al 0.12%

3.3.1. Operacionalización de las variables

Variables	Definición	Indicadores	Escala	Valor
El extracto etanólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	Sustancia concentrada de eucalipto, cuyas propiedades presentan efectividad antibacteriana.	Porcentajes de disolución del extracto etanólico de eucalipto.	Nominal	25% 50% 75% 100%
Efecto antibacteriano	Es la capacidad de inhibición del crecimiento de las bacterias debido a la presencia de un agente antibacteriano	Tamaño del diámetro del halo de inhibición formado alrededor del pozo.	Razón	Diámetro del halo de inhibición (0-X mm.)

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

Cepas de la bacteria anaerobia facultativa *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

3.4.2. Muestra

El tamaño muestral se calculó a partir de una fórmula de comparación de medias, en donde se consideró un nivel de confianza del 95% y una potencia del 80%. Los parámetros de media y desviación estándar fueron tomados de un estudio previo (Vela, 2017). Por lo cual, se determinó 10 lecturas por grupo de prueba. (Anexo B)

3.5. Instrumentos

Se observó directamente y se empleó como instrumento la regla de vernier para realizar la medición del diámetro del halo inhibitorio formada por el extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75%, 100% y como grupo control positivo la clorhexidina al 0.12% frente al *Streptococcus mutans* cepa ATCC 25175, a las 24 y 48 horas. Así mismo, los valores expresados en milímetros (mm) fueron registrados una ficha de recolección de datos confeccionada por la autora de esta investigación. (Anexo C)

3.6. Procedimientos

3.6.1. Elaboración del extracto etanólico

Se recolectó las hojas de eucalipto en la ciudad de Cerro de Pasco, Departamento de Pasco, Perú.

A partir de 1kg de hojas de eucalipto limpias y bien lavadas, fueron llevados a la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

Se dejó secar las hojas de eucalipto a temperatura ambiente, luego se procedió a la colocación en la estufa a una temperatura de 40°C por un período de 4 días y se comprobaron que se encuentren completamente secas para luego pasar a molerlas mecánicamente. Luego de verificar que las hojas estén totalmente secas, se trituraron hasta que estuvieran completamente

pulverizadas, se procedió a pesar 200g de las hojas pulverizadas y se almacenaron en un frasco ámbar en la oscuridad con 1000 ml de etanol a 96° por un tiempo de 2 semanas, agitando el frasco mecánicamente cada 6 horas. Luego se filtró el macerado con papel filtro Whatman N°42 y finalmente se prepararon las concentraciones al 25, 50, 75 y 100 mg/ml, las cuales fueron guardadas en frascos color ámbar estériles y almacenadas en refrigeración. (Anexo D y E)

3.6.2. Obtención de la cepa

La cepa utilizada en la presente investigación fue el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 obtenida del laboratorio GenLab del Perú, debido que cuentan con los certificados de análisis que garantizan la calidad y distribución de la cepa bacteriana. (Anexos F y G)

3.6.3. Preparación de los medios de cultivo

La preparación fue con 100 ml de agar de cerebro-corazón, según las instrucciones del fabricante (52 gramos para 1 litro de agua destilada) esta solución fue almacenada en un frasco de vidrio y posteriormente se esterilizó en autoclave. El agar ya esterilizado se dejó enfriar en baño maría a 45-50°C para ser vertidos en las placas Petri estériles.

Se prepararon 800 ml de agar Mueller Hinton en un frasco de vidrio de acuerdo con las instrucciones del fabricante (34 gramos para 1 litro de agua destilada). Se esterilizó el agar en autoclave a 121°C y 15 lb/pg² por un lapso de 15 minutos, luego de la autoclave se dejó enfriar a baño maría a una temperatura de 45 - 50°C, una vez obtenido un preparado fresco y tibio se vertió a las placas Petri de vidrio estériles, de esta forma, dando un fondo uniforme de aproximadamente de 4 mm, correspondiendo a un 25- 30 ml para placas de 90 mm de diámetro. Ya distribuido el agar se dejó solidificar a temperatura ambiente. El pH de cada lote de agar Mueller Hinton debe tener necesariamente un pH entre 7,0-7,6; esta medición se puede obtener sumergiendo el bulbo de electrodo del potenciómetro en el agar antes de colocar en la autoclave.

3.6.4. Activación de la cepa

En las placas con agar de cerebro-corazón se encontró la cepa refrigerada entre un rango con temperatura de 4 a 8°C., luego se tomó una colonia de la cepa con el asa bacteriológica para ser sembrados en tubos con caldo de cerebro-corazón estéril y se llevó a la incubadora a 37°C por un lapso de 24 horas, se observó una turbidez demostrando el crecimiento de la cepa. Se procedió a sembrar a las placas con agar de cerebro-corazón, luego se llevó 24 horas a la incubadora a una temperatura de 37°C.

Se preparó 100ml de suero fisiológico estéril (cloruro de sodio 0.9%), de los cuales se agregó volúmenes de 10ml a 4 tubos estériles.

3.6.5. Preparación del inóculo

Se tomó una cierta cantidad de colonias del microorganismo *Streptococcus mutans* ATCC 25175 para ser diluida en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de suero fisiológico estéril, se observó una turbidez correspondiente al tubo N°1 de la escala de MacFarland, correspondiendo una concentración de 3×10^8 ufc/ml.

De estas soluciones obtenidas se realizaron diluciones de 1 en 3, en el cual se tomaron 3 ml y se diluyeron a un volumen de 9 ml con suero fisiológico en tubos con tapa rosca y se obtuvo soluciones resultantes a una concentración de 1×10^8 ufc/ml.

3.6.6. Inoculación de las placas

En 10 placas con agar Mueller Hinton se incorporó 100 ul de cada inóculo bacteriano del preparado anterior (1×10^8 ufc/ml) esparciendo los inóculos en forma paralela y por toda la superficie de las placas, con de una espátula de Drigalsky y de esta forma obtener un crecimiento homogéneo. Este proceso se repitió en dos oportunidades más, rotando la placa a 60°; posteriormente se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de hacer los pocillos. Todo este procedimiento debe realizarse con sumo cuidado para evitar problemas en la realización de las lecturas.

3.6.7. Formación de los pocillos

Se formaron 6 pocillos con un sacabocado esterilizado en alcohol y flameado en el mechero, distribuyéndose de manera uniforme y a 15 mm del borde de la placa para evitar alguna superposición de los halos de inhibición.

3.6.8. Sembrado de las muestras y controles

En los 6 pocillos de cada una de las 10 placas Petri se añadieron 40ul de las 4 concentraciones del extracto etanólico de eucalipto, también se añadió 40ul del control positivo (clorhexidina al 0.12%) y finalmente 40uL del control negativo (agua destilada).

3.6.9. Incubación

Estas 10 placas preparadas con las diluciones de la muestra y los controles fueron llevados a una incubadora a 37°C por un período de 24 y 48 horas. (Anexos H)

3.6.10. Fase post analítica

Finalmente, cada placa fue examinada a las 24 y 48 horas de incubación, se midieron en milímetros los diámetros de la zona de inhibición completa, pasando por el centro de cada pocillo, esta medición se realizó tres veces para cada pocillo, estos tres valores se promediaron y se redondearon para registrarlos como un número natural. Es importante que las zonas de inhibición sean uniformemente circulares con una capa homogénea de crecimiento bacteriano. (Anexos I)

3.7. Análisis de datos

Se confeccionó una base de datos utilizando el programa Excel, los resultados posteriormente fueron exportados y procesados con el paquete estadístico SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) versión 24. Para el análisis descriptivo se utilizaron medidas de tendencia central (media aritmética y mediana) y dispersión (desviación estándar, mínimo y máximo) para describir el comportamiento de la variable dependiente estudiada. Luego para el análisis inferencial se realizó primero la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y la prueba de

homogeneidad de varianzas de Barlett (Anexo J), cuyos resultados demostraron que los datos reunían los requisitos para aplicar pruebas paramétricas; por ello, se comparó los halos de inhibición con el Test de Anova, luego para evaluar entre que concentraciones del extracto había diferencias significativas se utilizó la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Por último, para la comparación entre tiempos se utilizó la prueba Wilcoxon y la prueba t de Student, y así obtener un resultado prospectivo de un antes y un después. El nivel de significancia que se usó fue de 0.05 con un nivel de confianza de 95%.

IV. RESULTADOS

En el presente estudio se utilizó extractos etanólico de eucalipto en concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% con la finalidad de evaluar el efecto antibacteriano in vitro sobre cultivos de cepas del *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en 10 muestras durante un período de 24 y 48 horas.

Al comparar a las 24 horas la media del halo inhibitorio de la clorhexidina al 0.12% y extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se observó mayor halo de inhibición en el grupo del extracto etanólico al 100% con una media de 21.67 mm \pm 1.96 mm; la clorhexidina al 0.12% formó un halo inhibitorio con una media de 17.50 mm \pm 1.39 mm y el diámetro más bajo se obtuvo con el extracto etanólico al 25% con 12.92 mm \pm 0.99 mm; asimismo, se determinó diferencias significativas entre todos ($p < 0.05$), excepto entre la clorhexidina al 0.12% y extracto etanólico de eucalipto al 75% ($p > 0.05$).

Al comparar a las 48 horas la media del halo inhibitorio de la clorhexidina al 0.12% y extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 se observó mayor halo de inhibición en el grupo del extracto etanólico al 100% con una media de 20.12 mm \pm 2.00 mm; la clorhexidina al 0.12% formó un halo inhibitorio con una media de 17.00 mm \pm 1.12 mm y el diámetro más bajo se obtuvo con el extracto etanólico al 25% con 11.53 mm \pm 1.55mm; asimismo, se determinó diferencias significativas entre todos ($p < 0.05$), excepto entre la clorhexidina al 0.12% y el extracto etanólico de eucalipto al 75% ($p > 0.05$).

Tabla 1

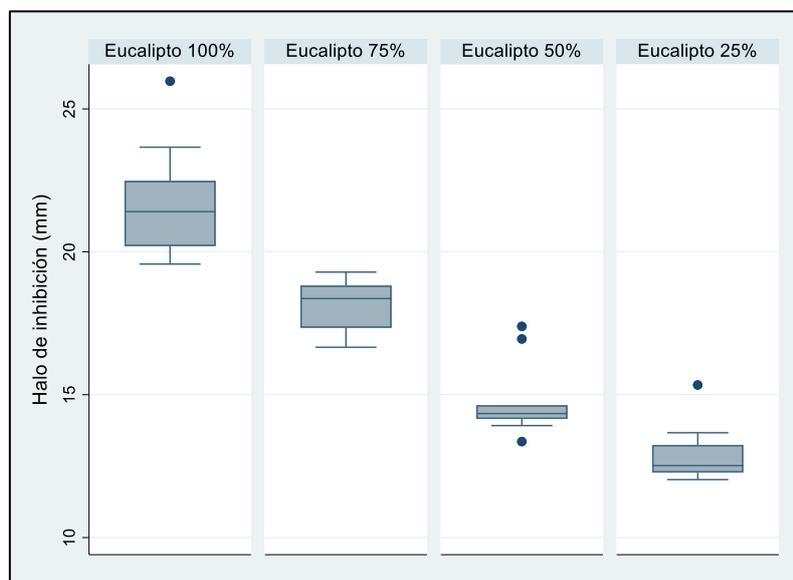
Valores descriptivos de los diámetros de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 horas.

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Mín.	Máx.
Extracto 100%	10	21.67	1.96	21.41	19.57	25.97
Extracto 75%	10	18.08	0.91	18.37	16.66	19.29
Extracto 50%	10	14.78	1.31	14.34	13.36	17.39
Extracto 25%	10	12.92	0.99	12.52	12.03	15.34

Nota. Se observa que a las 24 horas el extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó un mayor valor de la media del halo inhibitorio (21.67 mm \pm 1.96 mm), mientras que el extracto etanólico de eucalipto al 25% presentó un menor valor de la media del halo inhibitorio (12.92 mm \pm 0.99 mm). Además, el valor mínimo y máximo de medias de todos los grupos fue de 12.03 mm y 25.97 mm respectivamente.

Figura I.

Distribución de los valores del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 24 horas



Nota. Se observa que la mediana del halo de inhibición del extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó un mayor valor de la mediana comparado con las otras concentraciones de 75%, 50% y 25%.

Tabla 2

Valores descriptivos de los diámetros de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 48 horas.

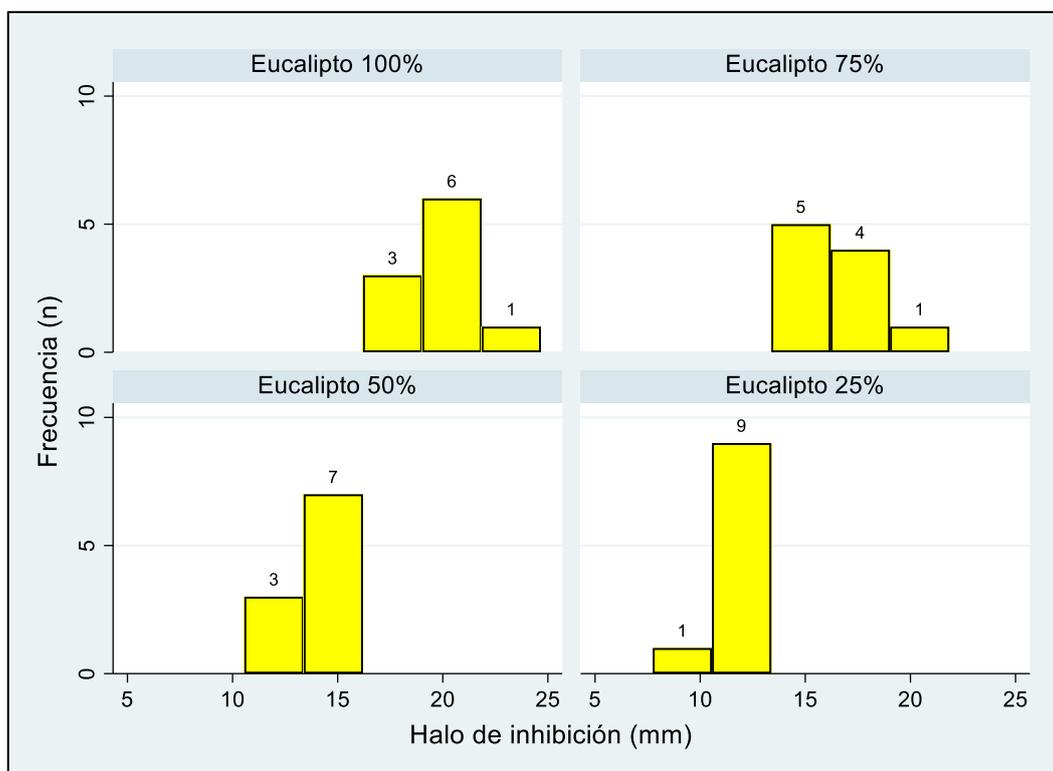
Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo
100%	10	20.12	2.00	19.68	17.70	24.67
75%	10	16.85	1.37	16.66	14.96	19.09
50%	10	13.80	0.90	13.90	12.48	15.53
25%	10	11.53	1.55	11.86	7.74	13.18

Nota. Se observa que a las 48 horas que el extracto etanólico de al 100% tuvo un mayor valor

de la media del halo inhibitorio con ($20.12 \text{ mm} \pm 2.00 \text{ mm}$); mientras que el extracto etanólico de eucalipto al 25% presentó un menor valor de la media del halo inhibitorio ($11.53 \text{ mm} \pm 1.55 \text{ mm}$). Además, el valor mínimo y máximo de medias de todos los grupos fue de 7.74 mm y 24.67 mm respectivamente.

Figura 2

Distribución de los valores del halo inhibitorio para los grupos evaluados a las 48 horas



Nota. se observa que la media del halo de inhibición del extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó un mayor valor, cercano a 20 mm, comparado con las otras concentraciones de 75%, 50% y 25%.

Tabla 3

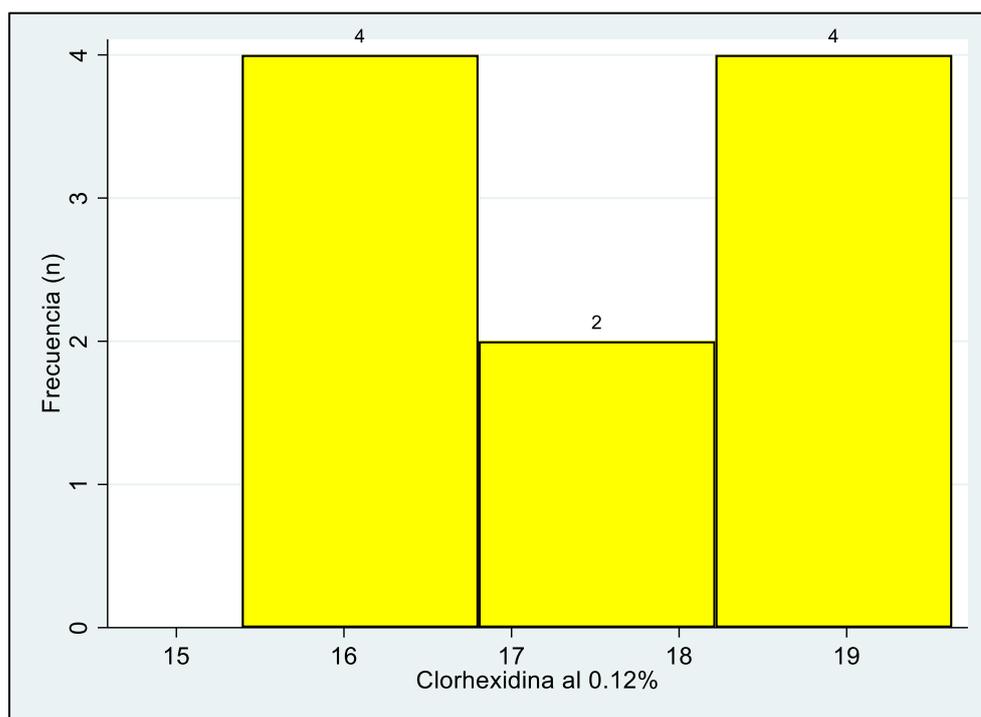
Valores descriptivos de los diámetros de los halos inhibitorios de la clorhexidina al 0.12% a las 24 horas.

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo
Clorhexidina	10	17.50	1.39	17.63	15.39	19.63

Nota. Se observa que a las 24 horas la media del halo de inhibición de la clorhexidina 0.12% fue de 17.50 mm con una desviación estándar de 1.39 mm.

Figura 3

Distribución de los valores del control positivo, clorhexidina al 0.12%, a las 24 horas.



Nota. Se observa la distribución de los valores del control positivo, clorhexidina al 0.12%, con un valor medio entre 17 y 18 mm a las 24 horas.

Tabla 4

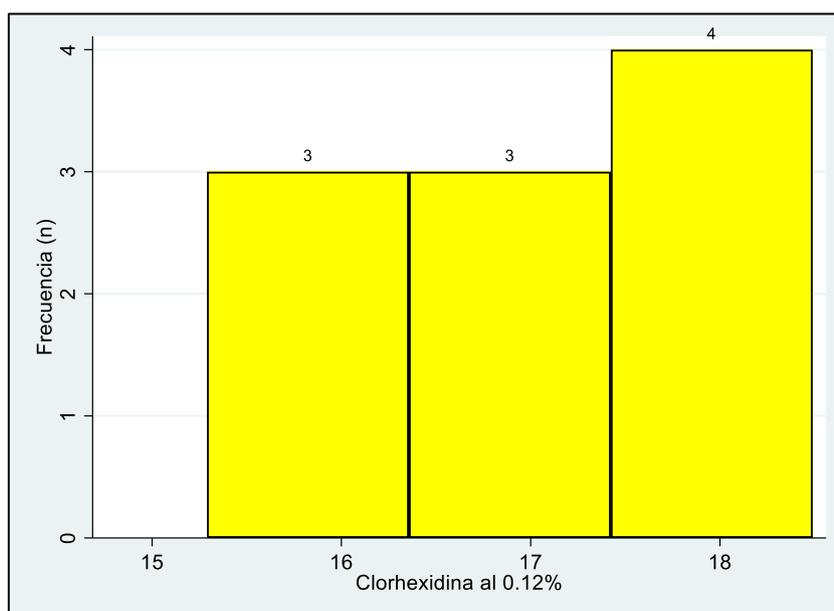
Valores descriptivos de los diámetros de los halos inhibitorios de la clorhexidina al 0.12% a las 48 horas.

Grupo	N°	Media	DS	Mediana	Mínimo	Máximo
Clorhexidina	10	17.04	1.12	17.07	15.29	18.49

Nota. Se observa que a las 48 horas la media del halo de inhibición de la clorhexidina 0.12% fue de 17.07 mm con una desviación estándar de 1.12 mm.

Figura 4

Distribución de los valores del control positivo, clorhexidina al 0.12%, a las 48 horas.



Nota. Se observa la distribución de los valores del control positivo, clorhexidina al 0.12%, con un valor de la media de 17 mm a las 48 horas.

Tabla 5

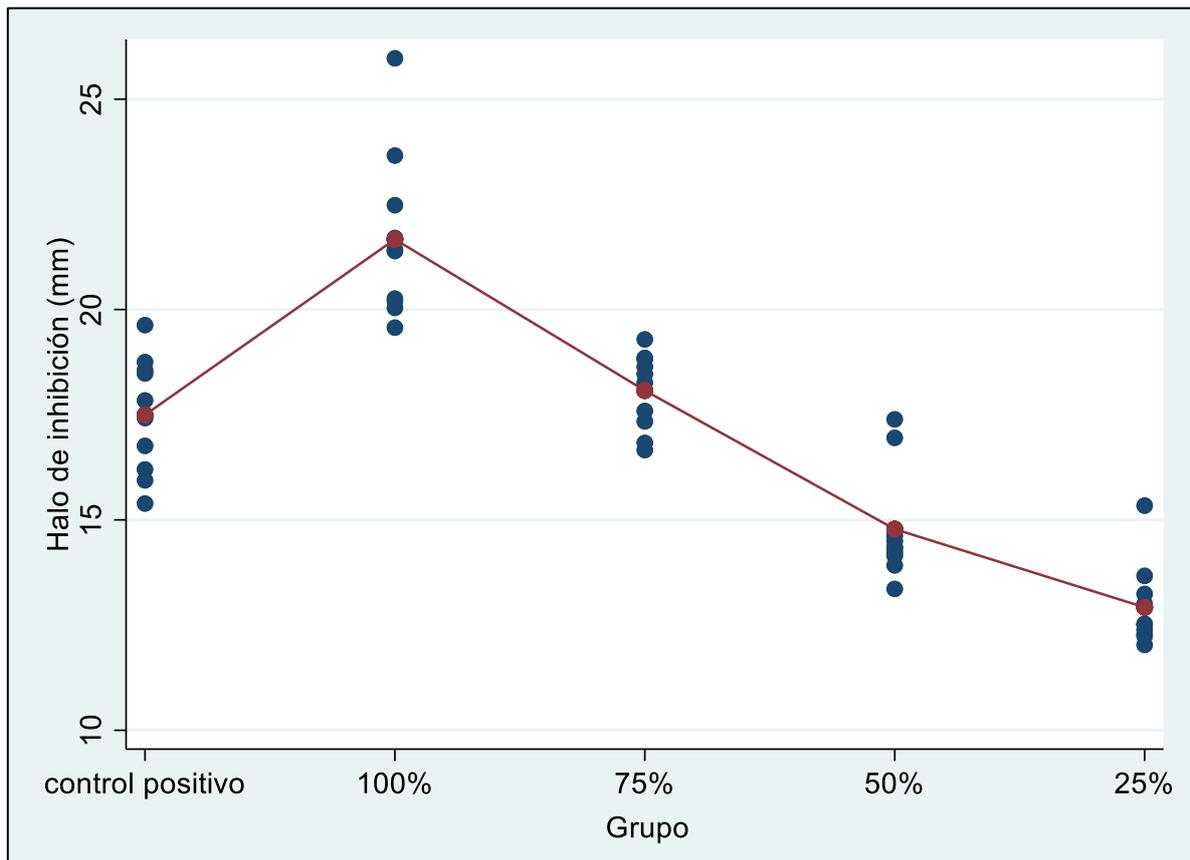
Comparación del promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% y la clorhexidina al 0.12% sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 horas.

Grupo	Control positivo	Extracto 100%	Extracto 75%	Extracto 50%
Extracto 100%	4.17*			
P	0.001			
Extracto 75%	0.58	-3.59*		
P	1.00	0.001		
Extracto 50%	-2.72*	-6.89*	-3.29*	
P	0.001	0.001	0.001	
Extracto 25%	-4.57*	-8.75*	-5.15*	-1.86*
P	0.001	0.001	0.001	0.039

Nota. Al realizar la prueba post-hoc de comparaciones múltiples por pares de Bonferroni, se determinó diferencias significativas entre todos ($p < 0.05$), excepto entre la clorhexidina al 0.12% y el extracto etanólico de eucalipto al 75% ($p > 0.05$). *La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 5

Comparación del promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% y la clorhexidina al 0.12% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 horas.



Nota. Se observa que el valor de la media del extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó el mayor valor cuando se comparó con los otros grupos a las 24 horas.

Tabla 6

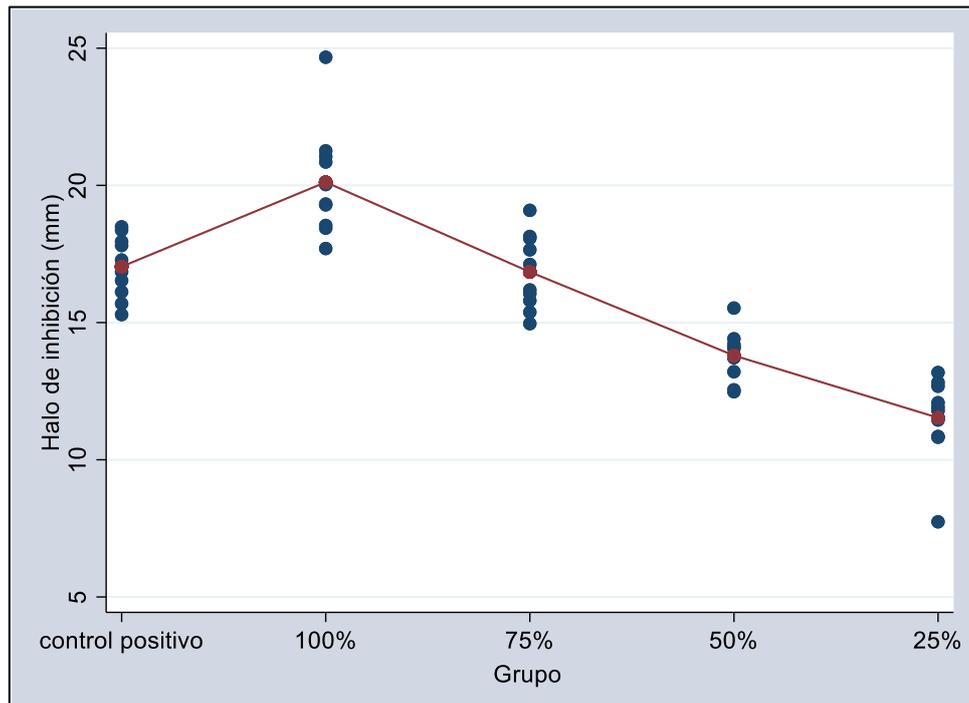
Comparación del promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% y la clorhexidina al 0.12% sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 48 horas.

Concentración	Control positivo	100%	75%	50%
100%	3.08*			
P	0.001			
75%	-0.19	-3.27*		
P	1.00	0.001		
50%	-3.24*	-6.31*	-3.05*	
P	0.001	0.001	0.001	
25%	-5.51*	-8.58*	-5.31*	-2.27*
P	0.001	0.001	0.001	0.01

Nota. Al realizar la prueba post-hoc de comparaciones múltiples por pares de Bonferroni, con esta se determinó diferencias significativas entre todos ($p < 0.05$), excepto entre la clorhexidina al 0.12% y el extracto etanólico de eucalipto al 75% ($p > 0.05$). * La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Figura 6

Comparación del promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% y la clorhexidina al 0.12% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 48 horas.



Nota. Se observa que el valor de la media del extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó el mayor valor cuando se comparó con los otros grupos a las 48 horas.

Tabla 7

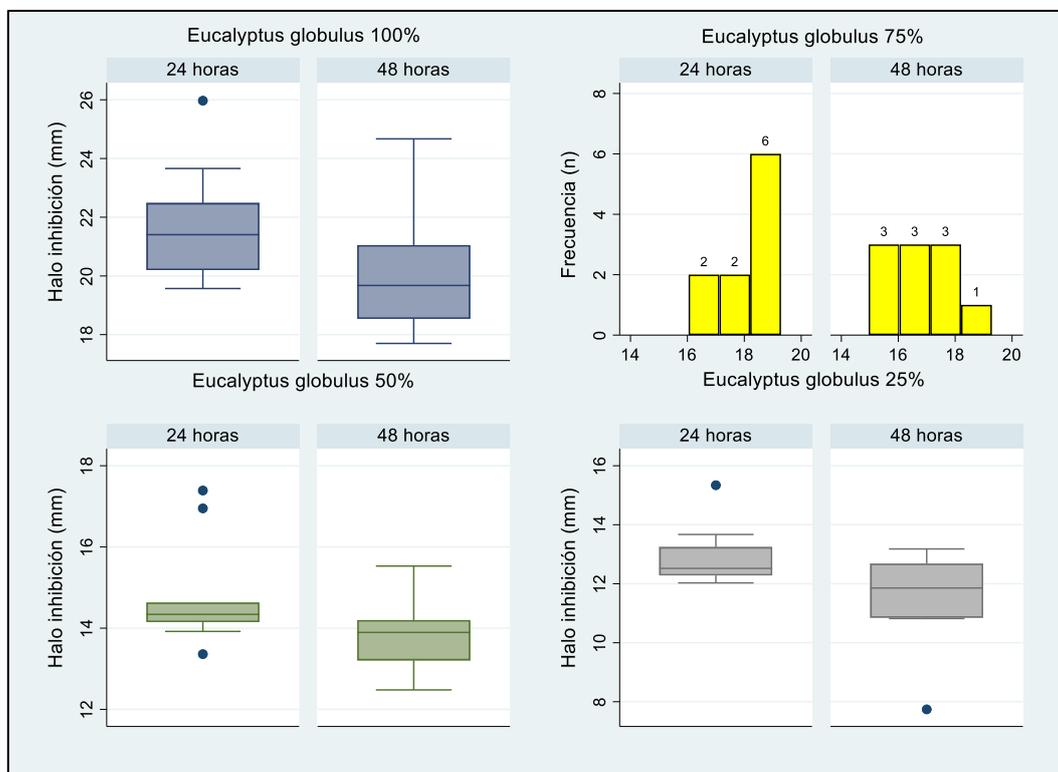
Comparación del promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175 a las 24 horas vs 48 horas.

Diámetro de halo de inhibición (mm) extracto etanólico de eucalipto									
24 horas					48 horas				
Concentración	Media	DS	Mediana	DIC	Media	DS	Mediana	DIC	24h vs 48h
100%	21.67	1.96	21.41	1.14	20.12	2.00	19.68	1.25	0.0051*
75%	18.08	0.91	18.37	0.72	16.85	1.37	16.66	1.13	0.0025**
50%	14.78	1.31	14.34	0.24	13.80	0.90	13.90	0.49	0.0051*
25%	12.88	1.02	12.46	0.5	11.53	1.55	11.86	0.91	0.0051*

Nota. Para las concentraciones de 100%, 50% y 25% se aplicó la prueba signo rango de Wilcoxon y se encontró que existen diferencias significativas de la mediana del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 entre las 24 horas y 48 horas con un valor de $p=0.0051$. Para la concentración de 75% se aplicó la prueba t de Student y se encontró que existen diferencias significativas de la media del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de eucalipto sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175 entre las 24 horas y 48 horas con un valor de $p=0.0025$. *Prueba signo rango de Wilcoxon, $p<0.05$ significativo. ** Prueba t de Student, $p<0.05$ significativo.

Figura 7

Gráfico combinado del valor medio y mediana del halo de inhibición según concentración de eucalipto



Nota. Se observa que el valor de la mediana para la concentración de eucalipto al 100% fue mayor para el grupo 24 horas que a las 48 horas, la media para eucalipto al 75% fue mayor para el grupo 24 horas que para el grupo 48 horas, la mediana para la concentración de eucalipto al 50% fue mayor para el grupo 24 horas que a las 48 horas, en el grupo de 24 horas se presentó valores extremos, la mediana para la concentración de eucalipto al 25% fue mayor para el grupo 24 horas que a las 48 horas con valores extremos en ambos grupos.

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Actualmente la medicina natural está siendo utilizada como tratamiento alternativo en las enfermedades que son causadas por diversos microorganismos como las bacterias patógenas relacionadas a la cavidad oral; por ello, se busca estudiar la efectividad antibacteriana de plantas medicinales; por lo cual nuestro propósito fue determinar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Nuestros resultados demuestran que el extracto etanólico de eucalipto a las diferentes concentraciones sí presenta efectividad antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans*, debido a que formaron halos inhibitorios, siendo el extracto de eucalipto al 100% con un mayor diámetro de 21.67mm. a las 24 horas.

Se demostró en nuestro estudio que a mayor concentración del extracto etanólico de eucalipto existe un mayor incremento del halo de inhibición sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175, siendo el 25% con menor halo inhibitorio y el 100% con mayor halo inhibitorio; coincidiendo con el estudio realizado por Cahuana y Condóri (2017), donde determinaron el efecto inhibitorio a diferentes concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 % sobre la bacteria *Streptococcus mutans*, demostrando que a mayor concentración se da mayor halo inhibitorio; es posible que, a mayor concentración presentan mayor componentes activos, por lo cual existan mayor efecto antibacteriano. De la misma manera, coinciden con los resultados de Vela (2017) cuyo estudio determinó que el promedio de los halos de inhibición de crecimiento de *Streptococcus mutans* fue mayor con el extracto etanólico de eucalipto al 100% que a concentraciones de 75% y 50%.

En nuestra investigación el extracto etanólico de eucalipto al 100% presentó el mayor efecto inhibitorio sobre el *Streptococcus mutans* a las 24 y 48 horas, dichos resultados tienen concordancia con el estudio de Abad (2019), quien determinó el efecto inhibitorio del aceite

esencial de eucalipto con diferentes concentraciones: 25 %, 50 %, 75 % y 100 % y como control positivo utilizó la clorhexidina al 2 %, observando que a las 24 y 48 horas la concentración al 100% obtuvo el mayor efecto inhibitorio; esto se puede deber a que el eucalipto presenta compuestos fenólicos.

Se realizaron 10 placas donde se observó que la clorhexidina al 0.12% obtuvo menor diámetro de halo inhibitorio que el extracto etanólico de eucalipto al 100%, lo que difiere con el estudio realizado por Carranza (2020) en el cual se evaluó el efecto del extracto de eucalipto sobre del crecimiento de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 24 horas en 10 placas mediante el análisis microbiológicos de discos, donde se determinó que el halo inhibitorio promedio de la clorhexidina al 0.12% fue mayor que el halo inhibitorio promedio del extracto puro de eucalipto al 100%; probablemente se deba a que en ambos estudios se usaron diferentes métodos de análisis microbiológicos. De la misma manera, difiere con la investigación realizada por Spoorthi et al. (2017), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de hojas de eucalipto a diferentes concentraciones mediante el análisis microbiológicos de difusión en pozo para determinar la zona de inhibición contra formas puras de *Streptococcus mutans*, como control positivo usó la clorhexidina y el ciprofloxacino, cuyos resultados demostraron que la clorhexidina obtuvo mayor diámetro de halo inhibitorio que los otros grupos; esto puede ser debido a que se usaron diferentes concentraciones para los grupos de clorhexidina y del extracto de eucalipto en los estudios.

En nuestro estudio a las 24 horas el extracto etanólico de eucalipto a diferentes concentraciones obtuvo mayor diámetro de halo inhibitorio comparado con el estudio realizado por Espín (2019), quien determinó que el aceite esencial de eucalipto a diferentes concentraciones de 50%, 75% y 100% a las 24 horas, presentó efecto antimicrobiano hacia el *Streptococcus mutans* pero con menor diámetro con respecto a nuestro trabajo; probablemente se deba, a que el extracto y el aceite de eucalipto contienen diferentes componentes activos.

VI. CONCLUSIONES

- Se concluye que el extracto etanólico de eucalipto al 25%, 50%, 75% y 100% sí presenta efectividad antibacteriana sobre el *Streptococcus mutans* ATCC 25175.
- A las 24 horas, el extracto etanólico de eucalipto al 100% obtuvo mayor media de halo inhibitorio, mientras que el extracto etanólico de eucalipto al 25% presentó la menor media de halo inhibitorio.
- A las 48 horas, el extracto etanólico de eucalipto al 100% obtuvo mayor media de halo inhibitorio, mientras que el extracto etanólico de eucalipto al 25% presentó la menor media de halo inhibitorio.
- Se observó que el extracto etanólico de eucalipto al 100% a las 24 horas presentó mayor promedio de diámetro de halo de inhibición, estadísticamente significativo, que la clorhexidina al 0.12%. ($p < 0.05$)
- Se observó que el extracto etanólico de eucalipto al 100% a las 48 horas presentó mayor promedio de diámetro de halo de inhibición, estadísticamente significativo, que la clorhexidina al 0.12%. ($p < 0.05$)
- Se demostró que el promedio del halo inhibitorio sobre el *Streptococcus mutans* se incrementa, estadísticamente significativo, a medida que la concentración del extracto etanólico de eucalipto aumenta. ($p < 0.05$)

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de eucalipto en otros microorganismos como la *Porphyromonas gingivalis*, la *Candida albicans*, los *Lactobacillus*, los *Actinomyces*, etc.
- Se sugiere comparar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de eucalipto con otros agentes antiplaca y antimicrobianos, en un estudio in vitro.
- Se recomienda promover estudios científicos sobre nuestros productos naturales en la aplicación del campo odontológico.
- Se sugiere evaluar los componentes activos presentes en el extracto etanólico de eucalipto a través de la marcha fitoquímica, así como la posibilidad de aislar cada componente.
- Se recomienda realizar estudios “in vivo” para evaluar la efectividad y la toxicidad que pueden generar los componentes activos del eucalipto a fin de demostrar si los resultados “in vitro” son similares.

VIII. REFERENCIAS

- Abad, A. B. (2019). *Efecto inhibitorio del aceite esencial de eucalipto (eucalyptus globulus) Con diferentes concentraciones frente al streptococcus mutans y porphyromonas gingivalis Estudio microbiológico in vitro*. [Tesis de pregrado, Universidad Internacional del Ecuador]. Repositorio Digital UIDE. <https://repositorio.uide.edu.ec/handle/37000/3806>
- Ajilore, B. S., Oluwadairo, T. O. y Olorunnisola, O. S. (2021). Análisis GC-MS, evaluaciones toxicológicas y de tolerancia oral a la glucosa del extracto metanólico de hojas de Eucalyptus globulus. *Futur J Pharm Sci*, 7(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00312-5>
- Banas, J. A. (2004) Virulence properties of Streptococcus mutans. *Front. Biosci. (Landmark Ed)* 9(2), 1267–1277. <https://doi.org/10.2741/1305>
- Barreiro, S. y Zambrano, R. W. (2021). Factores de riesgos que provocan la caries dental en los afiliados de la Unidad de Salud “La Piñuela”. *Revista Científica Higía de la Salud*, 5(2), 1-12. <https://doi.org/10.37117/higia.v1i5.586>
- Becerra, M. (2010). *Efecto antibacteriano "in vitro" del extracto etanólico y acuoso del Lactilobacillus spp.* [Tesis Doctoral, Universidad Privada Antenor Orrego] <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/KATHERINMELISSABECERRAJIM ENEZ.pdf>
- Beighton, D. (2005), The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 33(4), 248-255. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2005.00232.x>
- Berhan, M., Tizazú, Z., Kassahun, D., Ermias, L., Awol, M., Zegeye, N. y Shiferaw, Y. (2020). Safety Evaluation of *Eucalyptus globulus* Essential Oils through Acute and Sub-acute Toxicity and Skin Irritation in Mice and Rats. *actual química Biol.*, 14(3), 187–195. <https://doi.org/10.2174/2212796814999200818095036>

- Bermúdez, D., Monteagudo, E., Boffill, M., Díaz, L.E., Roca, A., Betancourt, E., y Silveira, E.A. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 8(3), 1-7. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613302006>
- Bowen, W. H., y Koo, H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries research*, 45(1), 69–86. <https://doi.org/10.1159/000324598>
- Brescia, C. (2022). *Plantas medicinales: El eucalipto*. Perú Desconocido. <https://perudesconocido.pe/plantas-medicinales/plantas-medicinales-el-eucalipto.html>
- Busuioc, M., Mackiewicz, K., Buttaro, B. y Piggot, P. (2009). Papel del polisacárido intracelular en la persistencia de *Streptococcus mutans*. *Revista de bacteriología*, 191 (23), 7315–7322. <https://doi.org/10.1128/JB.00425-09>
- Cahuana, L., y Condóri, T. (2017) *Efectividad Inhibitoria in vitro del extracto etanólico del Eucalyptus globulus sobre cepas de Streptococcus mutans y Candida albicans*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional del Altiplano]. Repositorio Institucional UNAP. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/4181>
- Carranza, L. (2020) *Efecto sinérgico de la combinación de extractos de Plantago Major, Eucalyptus globulus y Matricaria Chamomilla, en la inhibición del crecimiento de Streptococcus mutans (atcc 25175) in vitro*. [Tesis de pregrado, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo]. <https://repositorio.upagu.edu.pe/handle/UPAGU/1343>
- Chaudhari, L., Jawale, B., Sharma, S., Sharma, H., Mounesh Kumar, C. y Kulkarni, P. (2012). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales comercialmente disponibles contra *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*, 13 (1), 71-74. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1098>

- Cieplik, F., Jakubovics, N. S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., y Al-Ahmad, A. (2019). Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria—is there cause for concern? *Frontiers in microbiology*, *10*, 587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00587>
- Coswig, J., Do Nascimento, J. E., Jacob, R. G., Fiorentini, A., M., y Padilha Da Silva, W. (2014). Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Elsevier*, *60*, 304-309. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.030>
- Coykendall, A. L. (1989). Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical microbiology reviews*, *2*(3), 315–328. <https://doi.org/10.1128/CMR.2.3.315>
- Damjanović, B., Đakov, T., Suković, D. y Damjanović, J. (2011). Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Revista Checa de Ciencias de la Alimentación*, *29*(3), 277-284. <https://doi.org/10.17221/114/2009-CJFS>
- De Soet, J. J., Nyvad, B., y Kilian, M. (2000). Strain-related acid production by oral streptococci. *Caries research*, *34*(6), 486–490. <https://doi.org/10.1159/00001662815>.
- Duque, J., Pérez, J., e Hidalgo, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Rev Cubana Estomatol*, *43*(1), 47-55. Recuperado de <https://revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2475>
- Escribano, M., Matesanz, P., y Bascones, A. (2005). Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, *17*(2), 79-87. <https://doi.org/10.4321/s1699-65852005000200004>
- Espín, D. (2019). *Efecto inhibitorio del aceite esencial de eucalyptus globulus (eucalipto) vs syzygium aromaticum (clavo de olor) sobre cepas de Streptococcus mutans*. [Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio Digital UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/20518>

- Fonnegra, G. y Jiménez, R. (2007). *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Editorial Universidad de Antioquía.
- Gachkar, L., Yadegari, D., Bagher, M., Taghizadeh, M., Alipoor, S. y Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102(3), 898-904. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.035>
- Gutiérrez, S. J. (Ed.). (2006). *Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología*. Pontificia Universidad Javeriana.
- Harris, G. S., Michalek, S. M., y Curtiss, R. (1992). Cloning of a locus involved in *Streptococcus mutans* intracellular polysaccharide accumulation and virulence testing of an intracellular polysaccharide-deficient mutant. *Infection and immunity*, 60(8), 3175–3185. <https://doi.org/10.1128/iai.60.8.3175-3185.1992>.
- Kaspar, J. R., Godwin, M. J., Velsko, I. M., Richards, V. P. y Burne, R. A. (2019). Spontaneously Arising *Streptococcus mutans* Variants with Reduced Susceptibility to Chlorhexidine Display Genetic Defects and Diminished Fitness. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 63(7), e00161-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00161-19>
- Keyes, P. (1962). Recent advances in dental caries research. Bacteriological findings and biological implications. *Int Dent J*.12(4):443–64.
- Kleinberg, I. (2002). A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, 13(2), 108–125. <https://doi.org/10.1177/154411130201300202>

- Köhler, B., Birkhed, D., y Olsson, S. (1995). Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries research*, 29(5), 402–406.
<https://doi.org/10.1159/000262099>
- Landeo, G. (2018) *Actividad inhibitoria de los aceites esenciales comerciales de Mentha spicata y Eucalyptus globulus sobre biopelículas de Streptococcus mutans en un modelo in vitro* [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/7652>
- Liébana, J. (2002). *Microbiología oral*. McGraw-Hill Education.
- Liu, H., Lengua, L. A., León G., La Torre, C., Huapaya J. y Chauca, J. (2002) Evaluation of the antibacterial activity in vitro of the extracts of *Caesalpinia spinosa* tare and *Eucalyptus* sp. *Eucalyptus*. *Horiz. méd. (Impresa)*, 2(1/2), 64-69.
- Lozano., L., García, C., Iannacone, J. y Alvariano, L. (2017). Acute toxicity of three mouthwashes based on *plantago major*, *uncaria tomentosa* and *eucalyptus globulus* on brine shrimp *artemia franciscana*. *The Biologist (Lima)*, 15(2), 437-448.
<https://revistas.unfv.edu.pe/rtb/article/view/201/2110>
- Lukomska, M., Sokołowski, J., y Lapińska, B. (2017). Chlorhexidine – mechanism of action and its application to dentistry. *Journal of Stomatology*, 70(4), 405-417.
<https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5698>
- Matsumura, M., Izumi, T., Matsumoto, M., Tsuji, M., Fujiwara, T., y Oshima, T. (2003). The role of glucan-binding proteins in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiology and immunology*, 47(3), 213–215.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03389.x>
- Moncada, G. y Urzúa, I. (2008). *Cariología clínica*. Moncada Cortés, Gustavo.

- Monchois, V., Willemot, R. M., y Monsan, P. (1999). Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 131–151. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00394.x>
- Montero, M., Morocho, M., Avilés, D., Carrasco, Á., y Erazo, R. (2019). Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* sub sp. aureus. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 932-938. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16099>
- Montoya, J.M. (1995). *El Eucalipto*. Edita: Mundi- Prensa.
- Nascimento, M. M., Lemos, J. A., Abranches, J., Gonçalves, R. B., y Burne, R. A. (2004). Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. *Journal of bacteriology*, 186(19), 6383-6390. <https://doi.org/10.1128/JB.186.19.6383-6390.2004>
- Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica. Fundamentos y guía práctica. 2a edición*. Editorial Médica Panamericana.
- Ojeda, J. C., Oviedo, E., y Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. (*Streptococcus mutans* and dental caries). *CES Odontología*, 26(1), 44-56. <https://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/2684>
- Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K., y Kozai, K. (2005). Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *Journal of medical microbiology*, 54(7), 661–665. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46069-0>
- OMS (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. *Organización Mundial de la Salud*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95008>
- Osawa, K., Yasuda, H., Morita, H., Itokawa, H. y Takeya, K. (1995). Eucalyptone from *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry*, 40(1), 183-4. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00233-w](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00233-w)

- Oyama, K. O., Siquiera, E. L. y Santos, M. (2002). In vitro study of effect of solvent on root canal retreatment. *Brazilian dental journal*, 13(3), 208-211. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402002000300014>
- Pitts, N., Zero, D., Marsh, P., Ekstrand, K., Weintraub, J., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Ismail, A. y Tsakos, G. (2017). Dental caries. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17030. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
- Poppolo, F., y Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *International dental journal*, 72(3), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>
- Ragul, P., Dhanraj, M., y Jain, A. R. (2018). Efficacy of eucalyptus oil over chlorhexidine mouthwash in dental practice. *Drug invention today*, 10(5), 638-641.
- Raszewski, Z., Nowakowska-Toporowska, A., Weżgowiec, J., y Nowakowska, D. (2019). Design and characteristics of new experimental chlorhexidine dental gels with anti-staining properties. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, 28(7), 885–890. <https://doi.org/10.17219/acem/9415>
- Reyes, F., Palou, E. y López A. (2014) Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Disponible en: <https://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>.
- Schilling, K. M., y Bowen, W. H. (1992). Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity*, 60(1), 284–295. <https://doi.org/10.1128/iai.60.1.284-295.1992>
- Seyyednejad, S. M., Motamedi, H., Najvani, F. y Hassannejad, Z. (2014). Antibacterial Effect of *Eucalyptus microtheca*, *International Journal of Enteric Pathogens*, 2(2), 2. <https://doi.org/10.17795/ijep16515>

- Spoorthi, R., Sudarshini, N., Prashanthi, C. y Rohit, P. (2017) Antibacterial Effects of Natural Herbal Extracts on Streptococcus mutans: Can They Be Potential Additives in Dentifrices? *International Journal of Dentistry*, 17, 5. <https://doi.org/10.1155/2017/4921614>
- Tarte, R. (1986). *Silvicultura de especies promisorias para producción de leña en América Central*. CATIE- ROCAP.
- Ullah, A., Anjum, A. A., Rabbani, M., Nawaz, M., Ashraf, M., Ijaz, M., Ali, A., Rashid, A., Najeeb, I., y Pervez, A. (2021). Phytochemical composition and In-vitro activity of ethanolic extract of Eucalyptus globulus leaves against multidrug resistant poultry pathogens. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 67(1), 159–164. <https://doi.org/10.14715/cmb/2021.67.1.24>
- van Houte, J., de Moor, C. E., y Jansen, H. M. (1970). Synthesis of iodophilic polysaccharide by human oral streptococci. *Archives of oral biology*, 15(3), 263–266. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(70\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0003-9969(70)90084-1)
- Vela, L. (2017) *Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de eucalipto con gluconato de clorhexidina sobre el streptococcus mutans*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio institucional – UNITRU. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7534>
- Villafranca, F., Fernández, M., García, A., Hernández, L., López, L., Perillán, C., Díaz, B., Pardo, B., Álvarez, C., Alfonso, N., Mansilla, O. y Cobo, M. (2005). *Manual Del Técnico Superior en Higiene Bucodental*. Alianza Editorial.
- Zhu, W., Liu, S., Zhuang, P., Liu, J., Wang, Y., y Lin, H. (2017). Characterization of acid-tolerance-associated small RNAs in clinical isolates of Streptococcus mutans: Potential biomarkers for caries prevention. *Molecular Medicine Reports*, 16(6), 9242-9250. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7751>

IX. ANEXOS

Anexo A: Carta de presentación dirigida a la Facultad de Farmacia y Bioquímica - UNMSM



Universidad Nacional
Federico Villarreal

**FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA**

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO

Pueblo Libre, 31 de agosto de 2022

Doctor

EDUARDO FLORES JUARÉZ
DECANO - FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

ATENCIÓN: CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO (CCA) - CENPROFARMA
Q.F. PAUL IVAN GUTIERREZ ELESCANO

Presente .-

De mi especial consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a usted, con la finalidad de presentarle a la Bachiller en Odontología Srta. María del Rosario Chamorro Palacios, quien se encuentra realizando el Plan de Tesis titulado:

**«EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
EUCALYPTUS GLOBULUS (EUCALIPTO) SOBRE EL STREPTOCOCCUS MUTANS
ATCC 25175»**

En tal virtud, mucho agradeceré le brinde las facilidades del caso a la Srta. Chamorro quien realizará el siguiente trabajo:

- ✓ *Obtención del extracto etanólico del eucalipto y su evaluación del efecto antibacteriano sobre el Streptococcus Mutans en 10 placas petri en período de 24 y 48 horas*

ésta información le permitirá desarrollar su trabajo de investigación.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para renovar los sentimientos de mi especial consideración.

Atentamente



DR. FRANCO RAÚL MAURICIO VALENTÍN
DECANO



DR. AMÉRICO A. MUYAYCO MAGALLANES
JEFE
OFICINA DE GRADOS Y GESTIÓN DEL EGRESADO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Se adjunta: Plan de Tesis
029-2022
NT: 045072 - 2022

AAMM/luz V.

Calle San Marcos N°331 - Pueblo Libre
8335
e-mail: ogt.fo@unfv.edu.pe

Telef.: 7480888 -

Anexo B: Fórmula de comparación de medias

$$n = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{d^2}$$

$$n = \frac{(Z_\alpha + Z_\beta)^2 * (S_1^2 + S_2^2)}{d^2}$$

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 * (1.44 + 0.24)}{(20.3 - 19.1)^2}$$

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 * (1.44 + 0.24)}{1.2^2}$$

$$n = 9.14$$

n = Tamaño de muestra

Z_α = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

Z_β = Valor Z correspondiente al riesgo deseados

S^2 = Varianza

d^2 = Precisión o error máximo permisible

Anexo D: Fotografías de la elaboración del extracto etanólico de eucalipto



Hojas lavadas



Hojas en la estufa



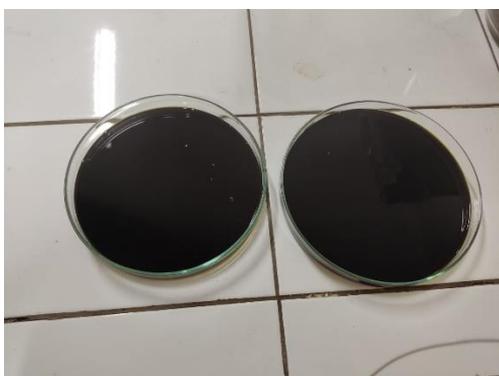
Molienda de hojas



Hojas pulverizadas en frasco ámbar con etanol.



Filtrado del extracto de eucalipto.



Extracto de eucalipto en la estufa.

Anexo E: Certificado de la elaboración del extracto etanólico del eucalipto



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00418-CPF-2022

ORDEN DE ANÁLISIS	: 03/19/2022
SOLICITADO POR	: MARIA DEL ROSARIO CHAMORRO PALACIOS
DIRECCIÓN	: -
MUESTRA	: EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Eucalyptus globulus</i> (EUCALIPTO)
CANTIDAD	: 1 Kg spors
NÚMERO DE LOTE	: -
FECHA DE RECEPCIÓN	: 03 de agosto del 2022
FECHA DE FABRICACIÓN	: -
FECHA DE VENCIMIENTO	: -

ENSAYO	CONCENTRACIÓN	RESULTADOS
EXTRACTO ETANOLICO	0.5% (p/v)	Conforme

Lima, 21 de noviembre de 2022



Q. F Paul Iván Gutiérrez-Elescano
Director del Centro de Control Analítico

FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO

Jr. Puno N° 1092 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
 ☎ (511) 019-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe




Anexo F: Recibo de compra de la cepa de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175



GenLab
del Perú

Gen Lab del Perú S.A.C
Jr. Capac Yupanqui N°. 2434
Lince - Lima - Perú
Central Telefónica
(51-1) 203-7500, (51-1) 203-7501
Email : ventas@genlabperu.com
Web Site : www.genlabperu.com

RUC N°:20501262260
FACTURA
ELECTRONICA
F002-002229

Page 1 of 1

Fecha emisión : 21/06/2022	Orden Compra: 054031
Fecha Vcto : 21/06/2022	Guía de Remisión :
Cliente: UNIVERSIDAD NAC. FEDERICO VILLARREAL	N° Pedido : 030832
Dirección: CAL.CARLOS GONZALES NRO. 285 RES. SAN MIGUEL SAN MIGUEL - LIMA - LIMA - Peru	
Tipo Mov. : ANTICIPOS	RUC: 20170934289
Lugar de destino : MZ. P LT. 17 AV. JOSÉ CARLOS MARIÁTEGUI - SJL	

Código	Descripción	Cant	U/M	Valor Unit.	Dscto	Sub-Total
H05666-A	KWIK-STIK Streptococcus mutans derived from ATCC® 25175™	1	UND	380.9322	0.00	380.93



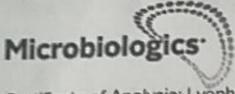
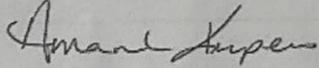
CONTADO			
Cuotas	Forma Pago	Importe	Fecha Venc.
1	Contado S/	449.50	21/06/2022
	Retención (3%) S/	0.00	
	Detracción (12%) S/	0.00	
	Penalidad		
	Monto Pendiente de Pago S/	449.50	

Sub-Total	380.93
Anticipo	
Op. Gravada S/	380.93
IGV 18%	68.57
Importe Total S/	449.50

CUATROCIENTOS CUARENTA Y NUEVE CON 50/100 SOLES

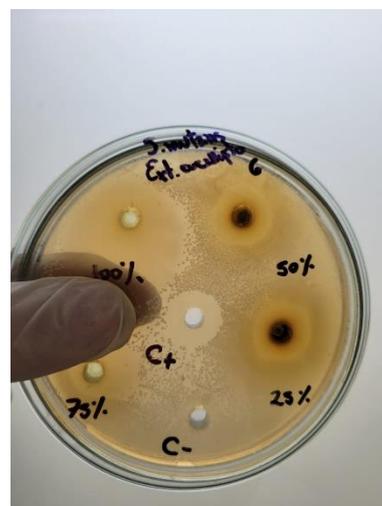
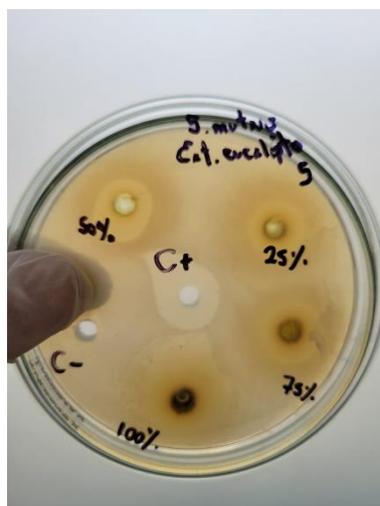
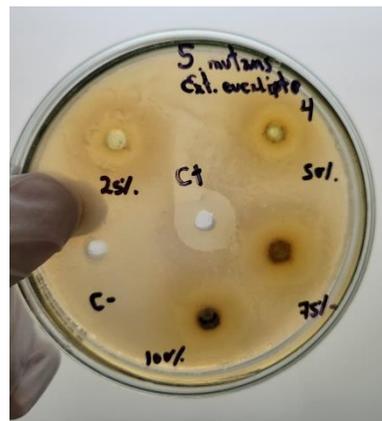
Representacion Impresa de la Factura Electrónica
Consulta : <http://cpe.genlabperu.com>

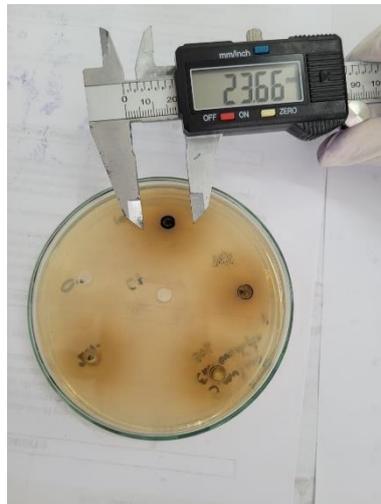
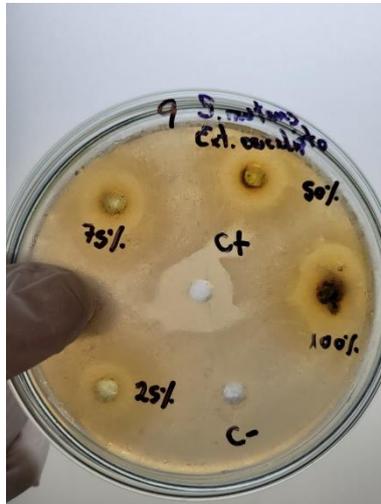
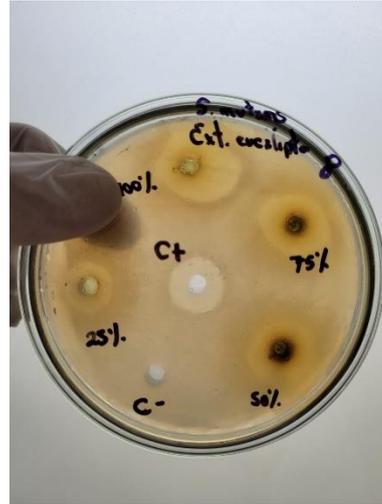
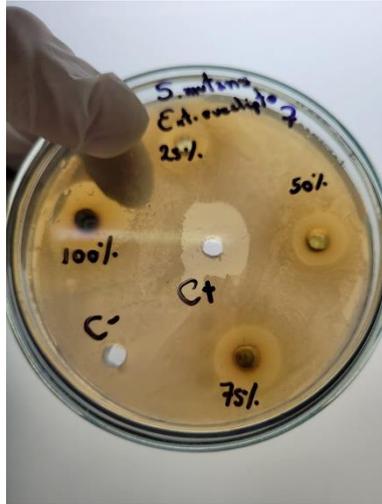
Anexo G: Certificado de análisis de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: Streptococcus mutans Catalog Number: 0266 Lot Number: 266-34** Reference Number: ATCC® 25175™* Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2023/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Madison C Vogt Release Date: 2021/9/16
Performance	
Macroscopic Features: Two colony types: small, circular, dome shaped, entire edge, white and the other is small, circular and translucent.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Small gram positive cocci to ovoid cells occurring singly, in pairs and predominately in chains	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): negative  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p>	
 REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02	<p>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</p>
 TESTING CERT #2655.01	

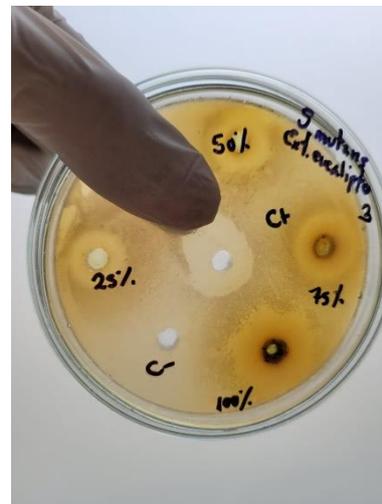
Anexo H: Fotografías de la evaluación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de eucalipto y clorhexidina al 0.12% sobre el *Streptococcus mutans*.

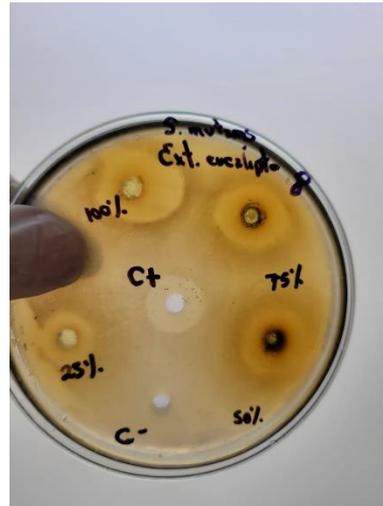
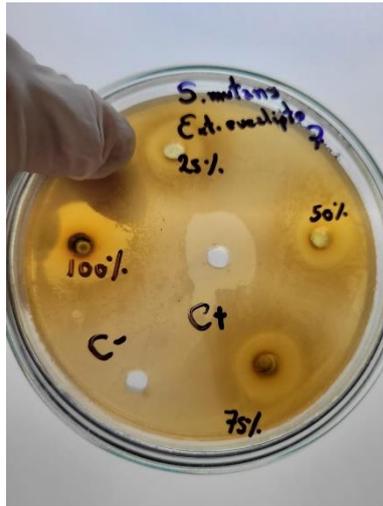
A las 24 horas.+





A las 48 horas





Anexo I: Informe de laboratorio y cálculos



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N° 00369 -CPF-2022

ORDEN DE ANÁLISIS : 0357-2022
SOLICITADO POR : CHAMORRO PALACIOS MARÍA DEL ROSARIO

DIRECCIÓN : MZ. P LT. 17 AV. JOSÉ CARLOS MARIÁTEGUI - LIMA

MUESTRA : EXTRACTO ETANÓLICO DE EUCALYPTUS
GLOBULUS (EUCALIPTO)

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO
RECEPCIONADO : 02 viales transparentes con tapa de goma y Parafilm rotulados
con cinta maskentape

CANTIDAD : 20 mL aprox.

FECHA DE RECEPCIÓN : 02 de Septiembre del 2022

EFICACIA ANTIMICROBIANA

MICROORGANISMO	EXTRACTO ETANÓLICO DE EUCALYPTUS GLOBULUS (EUCALIPTO)					
	Longitud de halos de inhibición (mm)					
	Control positivo	Control negativo	100%	75%	50%	25%
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 24 horas	18.48	6	23.66	19.29	14.63	12.51
	18.75	6	21.39	17.59	14.15	12.03
	19.63	6	22.48	18.26	14.23	12.53
	17.42	6	21.70	18.47	14.32	12.24
	17.84	6	20.26	17.34	14.50	13.67
	15.94	6	25.97	18.82	16.95	15.34
	16.76	6	20.04	16.66	13.92	12.28
	15.39	6	21.42	18.64	17.39	13.24
	18.56	6	19.57	16.83	14.36	13.00
	16.20	6	20.20	18.85	13.36	12.39

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



MICROORGANISMO	EXTRACTO ETANÓLICO DE EUCALYPTUS GLOBULUS (EUCALIPTO)					
	Longitud de halos de inhibición (mm)					
	Control positivo	Control negativo	100%	75%	50%	25%
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 48 horas	17.81	6	19.32	19.09	14.06	10.82
	18.49	6	21.05	17.12	12.48	11.92
	17.95	6	21.26	17.65	13.73	11.79
	17.28	6	20.85	18.07	12.55	10.85
	16.85	6	20.03	16.06	14.12	12.68
	15.69	6	24.67	15.80	14.41	7.74
	16.53	6	18.54	14.96	13.72	12.08
	15.29	6	17.70	16.19	15.53	13.18
	18.37	6	18.44	15.38	14.20	12.82
	16.12	6	19.29	18.14	13.21	11.45

- * El tamaño de los pocillos es de 6 mm, por lo tanto, cuando se reporta esta medida indica que no hay formación de halos de inhibición.
- * Volumen inoculado: 40 uL
- * Concentración del inóculo: 1×10^8 UFC/mL
- * Control positivo: Mucoxidina 0.12%
- * Control negativo: agua destilada
- * 100%, 75%, 50% y 25%: diluciones del extracto etanólico de Eucalyptus globulus (Eucalipto)

Lima, 27 de Octubre del 2022


Q.F. Paul Ivan Gutierrez Elescano
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



Anexo J: Pruebas paramétricas

Tabla 8*Prueba de distribución normal a las 24 horas*

Prueba de Shapiro-Wilk					
Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Control					
positivo	10	0.96	0.61	-0.80	0.79
100%	10	0.89	1.74	1.01	0.16
75%	10	0.92	1.16	0.26	0.40
50%	10	0.77	3.57	2.52	0.01
25%	10	0.80	3.09	2.19	0.01

Nota: A las 24 horas todos los grupos presentan distribución normal ($p > 0.05$), excepto los grupos 50% ($p = 0.01$) y 25% ($p = 0.01$).

Tabla 9*Prueba de distribución normal a las 48 horas*

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
Control					
positivo	10	0.95	0.80	-0.37	0.64
100%	10	0.90	1.54	0.78	0.22
75%	10	0.95	0.74	-0.50	0.69
50%	10	0.94	0.86	-0.26	0.60
25%	10	0.84	2.48	1.72	0.04

Nota: A las 48 horas todos los grupos presentan distribución normal ($p > 0.05$), excepto el grupo 25% ($p = 0.04$).

Tabla 10*Homogeneidad de varianzas a las 24 horas.*

Anova (Análisis de la varianza) de un factor					
Fuente	Suma de cuadrados	Grado de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Entre grupos	447.47	4	111.87	60.2	0.001
Dentro de los grupos	83.62	45	1.86		
Total	531.09	49	10.84		

Nota: A las 24 horas ($p=0.160$) se presentan homogeneidad de varianzas ($p>0.05$). Bartlett's equal-variances test: $\chi^2(4) = 6.5737$; $\text{Prob}>\chi^2 = 0.160$

Tabla 11*Homogeneidad de varianzas a las 48 horas.*

Anova (Análisis de la varianza) de un factor					
Fuente	Suma de cuadrados	Grado de Libertad	Promedio de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Entre grupos	434.27	4	108.57	52.54	0.001
Dentro de los grupos	92.99	45	2.07		
Total	527.27	49	10.76		

Nota: A las 48 horas ($p=0.187$) se presentan homogeneidad de varianzas ($p>0.05$). Bartlett's equal-variances test: $\chi^2(4) = 6.1661$; $\text{Prob}>\chi^2 = 0.187$

Anexo K: Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Metodología
<p>¿Cuál es la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) sobre el <i>Streptococcus Mutans</i> ATCC 25175 en un estudio in vitro?</p>	<p>Objetivo general: Evaluar la efectividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar in vitro el diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, a las 24 y 48 horas. - Determinar in vitro el diámetro del halo inhibitorio de la clorhexidina al 0.12% sobre el <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, a las 24 y 48 horas. - Comparar el promedio del diámetro de los halos inhibitorios del extracto etanólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) al 25%, 50%, 75% y 100% y la clorhexidina al 0.12% sobre el <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175, a las 24 y 48 horas. 	<p>Dado que el extracto etanólico del <i>Eucalyptus globulus</i> presenta propiedades antimicrobianas; es probable que tengan efectividad inhibitoria sobre la formación del <i>Streptococcus mutans</i> cepa ATCC 25175.</p>	<p>Variable independiente: El extracto etanólico de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto) en diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%).</p> <p>Variable dependiente: Efectividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Eucalyptus Globulus</i></p>	<p>Tipo de investigación: Experimental in vitro, prospectivo, longitudinal y analítico</p> <p>Población: Cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Muestra: conformada por 10 placas petri, con cepas de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p> <p>Muestreo: muestreo no probabilístico por conveniencia.</p> <p>Unidad de análisis: Una placa petri inoculada con cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175.</p>