UNIVERSIDAD SEÑOR DE SIPÁN

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

TESIS

COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* ENTRE EL EXTRACTO HIDROETANÓLICO Y EL EXTRACTO ACUOSO DE *Minthostachys mollis* CONTRA *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

Autor:
Rosa Flor Arriola García

Asesor:
Dra. CD. Marisel Roxana Valenzuela Ramos

Línea de Investigación:
Respuestas Biológicas en Terapias Estomatológicas

Pimentel – Perú
2018

COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO ENTRE EL EXTRACTO HIDROETANÓLICO Y EL EXTRACTO ACUOSO DE *Minthostachys mollis* CONTRA *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

APROBACIÓN DEL INFORME DE INVESTIGACIÓN

Dra.CD. Valenzuela Ramos Marisel Roxana

Asesora Metodóloga

Mg. CD. José José Espinoza Plaza

Presidente del jurado de tesis

Dra. Blga. Clara Luisa Del Carmen Henckell Sime

Secretario del jurado de tesis

Dra.CD. Paola Beatriz La Serna Solari

Vocal del jurado de tesis

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por haberme permitido llegar hasta este punto; por su infinita bondad, amor y misericordia. Por haberme dado salud, fuerzas, sobre todo por nunca dejarme sola ante cualquier adversidad y abrirme puertas para lograr mis objetivos.

A mis padres Rosa Del Pilar García CH. y Cesar Augusto Arriola S. por haberme apoyado en todo momento, por la motivación constante que ha permitido no rendirme, por haber inculcado en mí valores morales, asimismo por su dedicado sacrificio que me sirven de ejemplo para lograr mis metas trazadas.

A mis hermanos por su alentadora inspiración, su comprensión y por qué siempre estarán a mi lado cuando los necesite.

A mis amigos y maestros por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales, por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional, así como para la elaboración de esta tesis. En especial al Microbiólogo Ruiz Barrueto Miguel Ángel por su asesoría durante este proceso de ejecución y por ser ejemplo como profesional e impulsarme hacia la investigación.

AGRADECIMIENTO

A Dios todopoderoso por su infinito amor y misericordia, por haberme abierto puertas para realizar la presente tesis.

A mis padres que estuvieron presentes siempre en el transcurso de este camino de aprendizaje universitario, por su apoyo constante y por ser el pilar en mi vida.

Mi Asesora y profesora Dra. CD. Marisel Roxana Valenzuela Ramos quién me dio la confianza, al darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de tesis, con disciplina, constancia, responsabilidad, por sus enseñanzas y sobre todo por compartir su tiempo para la culminación del presente trabajo.

El jurado integrado por el Mg. CD. José José Espinoza Plaza; Dra. Blga. Clara Luisa Del Carmen Henckell Sime y la Dra. CD. Paola Beatriz La Serna Solari por sus correcciones oportunas y completa disposición en la evaluación del trabajo.

Al microbiólogo Dr. Miguel Ángel Ruiz Barrueto y Mg. Jorge Luis Leiva Piedra por su orientación, asesoría y disponibilidad en la parte investigativa de mi tesis y por ser como ejemplo de imagen en sus enseñanzas en mi formación de pregrado.

Mi Familia, amigos y colegas quienes, sin estar involucrados directamente, me dieron su apoyo para seguir adelante.

RESUMEN

Título. Comparación del efecto antibacteriano *in vitro* entre el extracto hidroetanólico y el extracto acuoso de *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Objetivo.** Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* entre el extracto hidroetanólico y el extracto acuoso del *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Método.** Los métodos utilizados para la obtención de los extractos fueron; para el extracto acuoso método de ebullición y para el extracto hidroetanólico método de maceración. Las concentraciones de extracto evaluadas fueron de 15 mg/ml, 30 mg/ml y 45 mg/ml para ambos extractos. Para la evaluación del efecto antibacteriano se utilizó el método de difusión con disco. Para ello se evaluaron 20 unidades de ensayo (placas petri) en cada concentración y por cada extracto. El medio de cultivo utilizado para los ensayos fue agar mitis salivarius y las condiciones de incubación fueron en atmósfera de aerobiosis a 36,5 ºC durante 24 horas. **Resultados.** Se observa que existe diferencia estadísticamente significativa ($p<0,05$) entre el efecto del extracto acuoso y el extracto hidroetanólico. Se observa que el extracto hidroetanólico de *Minthostachys mollis* tuvo mayor efecto inhibitorio al generar un halo de inhibición promedio de 23,87 mm que el extracto acuoso que generó un halo de inhibición promedio de 9,07mm. El control positivo que fue gluconato de clorhexidina al 2% generó un halo promedio de 28,6 mm siendo superior al de ambos extractos. **Conclusión**. El efecto antibacteriano de las concentraciones de 15 mg/ml, 30 mg/ml y 45 mg/ml del extracto hidroetanólico de *Minthostachys mollis* es superior al del extracto acuoso de *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pero menor al generado por gluconato de clorhexidina al 2%.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, *Minthostachys mollis*, *Enterococcus faecalis*.

ABSTRACT

Title. Comparison of the in vitro antibacterial effect between the hydroethanolic extract and the aqueous extract of *Minthostachys mollis* against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. **Objective.** To compare the in vitro antibacterial effect between the hydroethanolic extract and the aqueous extract of Minthostachys mollis against Enterococcus faecalis ATCC 29212. **Method.** The methods used to obtain the extracts were; for the aqueous extract boiling method and for the hydroethanolic extract maceration method. The extract concentrations evaluated were 15 mg / ml, 30 mg / ml and 45 mg / ml for both extracts. For the evaluation of the antibacterial effect, the disc diffusion method was used. For this, 20 test units (petri dishes) were evaluated in each concentration and for each extract. The culture medium used for the assays was agar mitis salivarius and the incubation conditions were in an aerobiosis atmosphere at 36.5 oC for 24 hours. **Results.** It is observed that there is a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the effect of the aqueous extract and the hydroethanolic extract. It is observed that the hydroethanolic extract of Minthostachys mollis had greater inhibitory effect by generating an average inhibition halo of 23.87 mm than the aqueous extract that generated an average inhibition halo of 9.07 mm. The positive control that was 2% chlorhexidine gluconate generated an average halo of 28.6 mm, being superior to both extracts. **Conclusion.** The antibacterial effect of the concentrations of 15 mg / ml, 30 mg / mL and 45 mg / mL of the hydroethanolic extract of Minthostachys mollis is superior to that of the aqueous extract of Minthostachys mollis against Enterococcus faecalis ATCC 29212 but less than generated by 2% chlorhexidine gluconate.

Keywords: Antibacterial effect, *Minthostachys mollis*, *Enterococcus faecalis*.

ÍNDICE

APROBACIÓN DEL INFORME DE INVESTIGACIÓN……...…… 1
DEDICATORIA……. 2
AGRADECIMIENTO…… 3
RESUMEN……. 4
ABSTRACT……..…… 5
ÍNDICE 6
I. INTRODUCCIÓN 7
1.1. Realidad Problemática. 8
1.2. Trabajos previos. 9
1.3. Teorías relacionadas al tema. 16
1.4. Formulación del Problema 23
1.5. Justificación e importancia del estudio. 23
1.6. Hipótesis. 24
1.7. Objetivos. 25
1.7.1. Objetivo General 25
1.7.2. Objetivos Específicos 25
II. MATERIAL Y MÉTODOS 26
2.1. Tipo y Diseño de Investigación. 26
2.2. Población y muestra. 26
2.3. Variables, Operacionalización. 27
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad. 28
2.5. Procedimientos de análisis de datos. 31
2.6. Aspectos éticos. 31
2.7. Criterios de Rigor Científicos 31
III. RESULTADOS 32
3.1. Tablas y Figuras 32
3.2. Discusión de resultados 35
IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 37
4.1. Conclusiones 37
4.2. Recomendaciones 37
REFERENCIAS 38
ANEXOS 43

I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS), refiere que las enfermedades periodontales graves, que pueden desencadenar la pérdida de dientes, afectan a un 15%-20% de los adultos de edad media (35-44 años). Así mismo Alrededor del 30% de la población mundial con edades comprendidas entre los 65 y los 74 años no tienen dientes naturales. Por otra parte, han establecido que las enfermedades bucodentales, tanto en niños como en adultos, tienden a ser más frecuentes entre los grupos pobres y desfavorecidos.[1]

En ese contexto, se ha comprobado que los microorganismos patógenos responsables de infecciones en canales radiculares son principalmente actinomicetos y *Enterococcus faecalis*. Las tasas de detección de *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* y *A. israelii*, fueron 80%, 20% y 26.67% respectivamente y la de *Enterococcus faecalis* fue de 73,3%.[2] Existe evidencia de la transmisión de *Enterococcus faecalis* a través de los alimentos, lo que explica su alta prevalencia reportada en raíces dentales tratadas. Se ha determinado que los genes *gelE*, *efaA* y *ace* son responsables de los procesos de agregación y de su capacidad de resistencia a antibióticos constituyéndose en sus principales factores de virulencia.[3]

La complejidad de la anatomía dental y del conducto radicular, dificultan la desinfección de este sistema, asimismo la proliferación de microorganismos es un factor principal en la falla del tratamiento del conducto radicular y esto podría tener un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes.[4] Por otro lado, existen reportes que *Enterococcus faecalis* sea la principal bacteria responsable en los tratamientos fallidos del conducto radicular y, que aún persiste después del tratamiento endodóntico. [5]

La OMS recomienda la búsqueda de nuevas alternativas de control microbiano que contrarresten en desarrollo de resistencia en los microorganismos. Una de estas alternativas es la fitoterapia o utilización de componentes vegetales para atenuar síntomas e incluso curar enfermedades de distinta índole. Los principios bioactivos vegetales principales con actividad antibacteriana comprobada sobre Gram positivos y Gram negativos son los aldehídos, terpenos, flavonoides entre otros.[6]

Todo lo anteriormente dicho motivó la interrogante ¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* el extracto hidroetanólico y el extracto acuoso del *Minthostachys mollis*

(muña) contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212? Con el afán de responder a esta interrogante nos planteamos determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico y extracto acuoso de *Minthostachys mollis* (muña) contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

1.1. Realidad Problemática

Enterococcus faecalis es una bacteria habitante normal del tracto gastrointestinal de humanos, capaz de colonizar la cavidad oral. Está asociado a lesiones de la mucosa oral en pacientes inmunocomprometidos, con periodontitis e infecciones del conducto radicular. Un reporte de 8 casos de pulpectomía reportó que, el 75% de estos tuvieron éxito y el 25% falló y *E. faecalis* estuvo presente en el 50% de los casos exitosos y fallidos.[7]

Una infección endodóntico secundaria persistente puede ser el resultado del fracaso del tratamiento endodóntico. En un estudio se reportó que el 25,8% de las especies aisladas en casos de fracaso endodóntico fueron principalmente bacterias anaeróbicas o microaerófilas obligatorias, incluyendo *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Propionibacterium acnes* y *Lactobacillus acidophilus*, y el 74,2% fueron anaeróbicas facultativas como *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces naeslundii*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *S. sanguinis*, *S. mitis* y *Candida albicans*.[8, 9]

En actualidad se emplean técnicas vanguardistas que han sido consideradas de gran ayuda al diagnóstico, en 10 estudios que abarcan 972 dientes. Dos de ellos utilizaron la técnica de cultivo, seis utilizaron PCR y los otros dos utilizaron ambas técnicas. La tasa de detección de *E. faecalis* por ambos métodos fue mayor en las infecciones persistentes.[10] *Enterococcus faecalis* es considerada la especie bacteriana más frecuente presente en la enfermedad pos tratamiento, es muy tolerante en ambientes difíciles debido a su capacidad para formar biopelículas.[11]

1.2. Trabajos previos

Arévalo-Híjar L, et al. (2018). En su investigación titulada efectos antibacterianos y citotóxicos de los extractos metanólicos de *Moringa oleifera* (Moringa) y *Azadirachta indica* (Neem) contra las cepas de *Enterococcus faecalis*. Su objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano y citotóxico de 2 extractos metanólicos de *Azadirachta indica* y *Moringa oleifera* contra cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in vitro. Los extractos metanólicos de Azadirachta indica y Moringa oleifera se prepararon in vitro. El efecto antibacteriano de los extractos contra *Enterococcus faecalis* se evaluó utilizando la técnica de difusión en agar. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó utilizando el método de microdilución y la citotoxicidad utilizando la línea celular MDCK. El extracto metanólico tuvo el efecto más antibacteriano durante las primeras 24 y 48 horas contra *Enterococcus faecalis* fue *Moringa oleifera*, que evidenció una zona de inhibición del crecimiento de 35.5 mm y 44.83 mm, respectivamente. La CIM para ambos extractos fue de 75 µg/ml. El efecto bactericida de la *Azadirachta indica* extracto se encontró a una concentración de 25 µg/ml y una concentración de 75 µg/ml para Moringa extracto. En conclusión, demostramos que el extracto metanólico de *Azadirachta indica* y *Moringa oleifera* tienen un efecto antibacteriano contra las cepas de *Enterococcus faecalis* durante las primeras 24 y 48 horas. Ninguno de los extractos mostró toxicidad contra las líneas celulares en bajas concentraciones.[12]

Charannya S, et al. (2018). En su investigación titulada; evaluación comparativa de la eficacia antimicrobiana de nanopartículas de plata y gluconato de clorhexidina al 2% cuando se usa solo y en combinación evaluada utilizando el método de difusión en agar: un estudio in vitro. Su objetivo fue evaluar la eficacia de AgNPs, 2% de gluconato de CHX y la combinación de dos soluciones contra patógenos endodóntico como *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans*. Estos organismos se encuentran con frecuencia en el espacio del conducto radicular y su persistencia puede conducir a un fallo endodóntico. El efecto sinérgico de las dos soluciones ha sido evaluado en este estudio. El antibiótico gentamicina se tomó como grupo de control. Se utilizó el método de difusión en pozo de agar y se encontró que la concentración inhibitoria mínima de AgNP era de 15 µg/ml. Los AgNPs se sintetizaron a partir

del extracto vegetal acuoso de *Cassia roxburghii*. La combinación de la solución de CHX-AgNP se agitó junto con una varilla de vidrio. Los valores se tabularon y se sometieron a análisis estadístico utilizando el software SPSS versión 20. Se utilizó la prueba ANOVA de una vía para comparar dentro de los grupos y entre grupos. El nivel de significación se fijó en el 5%. La solución combinada de CHX-AgNP exhibió la mayor eficacia en comparación con estas soluciones usadas solas. Mostraron la mayor eficacia contra *C. albicans* entre los tres organismos analizados. El presente estudio demuestra la eficacia antimicrobiana de una mezcla novedosa de solución CHX-AgNP, y puede desarrollarse como un agente antimicrobiano prometedor contra la flora endodóntica.[13]

Kiari F, et al. (2018). En su investigación titulada estudio in vitro sobre la actividad del aceite esencial y el extracto metanólico de la argelina Nigella sativa L. Semillas en la cinética de crecimiento de microorganismos aislados de las cavidades bucales de los pacientes periodontales. Se realizó una evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial (OE) y el extracto de metanol (ME) de las semillas argelinas de *Nigella sativa* L. frente a cepas microbianas aisladas de las cavidades orales de los pacientes periodontales. Se aislaron e identificaron doce bacterias grampositivas, once bacterias gramnegativos y tres cepas de hongos microscópicos. Las actividades antimicrobianas de EO y ME se probaron contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* sp., *Acinetobacter baumannii*/*calcoaceticus*, *Porphyromonas* sp., *Veillonella* sp., *Candida* sp. y *Saccharomyces* sp. Los contenidos totales de polifenoles y flavonoides de ME fueron mayores que los de EO. El análisis de la actividad antimicrobiana de los extractos de *N. sativa* obtenidos por el método de microdilución mostró una excelente actividad bactericida del aceite esencial y una eficiencia moderada de la ME contra todos los microbios analizados. *Staphylococcus epidermidis* y *Porphyromonas* sp. fueron los más sensibles a la OE (concentración mínima bactericida (CMB): 16.500 μg / ml) a las 48 h de incubación y 125.000 μg / ml de ME fueron los más activos contra todos los microbios analizados. Sin embargo, después de 18 o 24 h, esta eficiencia disminuyó en algunas cepas. Además, *Saccharomyces* sp. y *Candida albicans* fue más sensible a EO que a ME durante la incubación,

mientras que esta eficiencia fue claramente no visible con el método del pozo de agar, y la mayoría de los microbios probados presentaron una resistencia notable a estos extractos.[14]

Kohli D, et al. (2018). En su investigación titulada evaluación comparativa de la susceptibilidad antimicrobiana y la citotoxicidad del extracto de cáscara de Cocos nucifera y clorhexidina como soluciones de irrigación contra *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis* - Un estudio in vitro. El objetivo del presente estudio fue evaluar y comparar la susceptibilidad antimicrobiana y la citotoxicidad de *Cocos nucifera* y clorhexidina (CHX) como soluciones de irrigación contra *Enterococcus faecalis*, *Prevotella intermedia* y *Porphyromonas gingivalis*. Se preparó el extracto etanólico de cáscara de C. nucifera. La concentración inhibitoria mínima (MIC) y la concentración bactericida mínima (MBC) del extracto se determinaron mediante el método de dilución en serie del caldo y se evaluó su citotoxicidad frente a los fibroblastos periodontales humanos utilizando 3- (4,5-dimetil-tiazol-2-ilo) Ensayo de bromuro de -2,5-difenil tetrazolio. La susceptibilidad antibacteriana para dos soluciones de irrigación, concretamente el irrigante de gluconato de CHX al 2% (Grupo I) y el irrigante de cáscara de C. nucifera al 1.5% (Grupo II), se probó contra P. gingivalis, P. intermedia y E. faecalis. La CMI y el MBC del extracto de cáscara de C. nucifera para P. gingivalis fueron 468.75 µg / ml y 1562.5 µg / ml, para P. intermedia 48.8 µg / ml y 1875 µg / ml, y para E. faecalis fueron 1562.5 µg / ml y 3750 µg / ml, respectivamente. El extracto no era tóxico para el fibroblasto periodontal humano. Ambos materiales han mostrado una susceptibilidad antibacteriana similar y no se observaron diferencias al inicio del estudio, 10, 30 y 60 min utilizando medidas repetidas de ANOVA de dos vías. Sin embargo, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los diferentes puntos de tiempo para P. gingivalis y P. intermedia utilizando la prueba de comparación múltiple de Bonferroni ($f = 826.1390$, $P \leq 0.05$). El 1,5% del extracto etanólico de cáscara de C. nucifera tiene una acción antibacteriana significativa contra el biofilm dental polimicrobiano y su actividad es comparable a la del 2% de CHX, lo que valida su uso como una futura solución de irrigación para superar la resistencia bacteriana con agentes sintéticos.[15]

Noushad M, et al. (2018). En su investigación titulada eficacia antimicrobiana de diferentes extractos naturales contra patógenos persistentes del canal de la raíz: un estudio in vitro. Su objetivo es comparar la eficacia antimicrobiana de diferentes extractos naturales tales como hoja de guayaba extracto, Aloe vera extracto, hoja papaya extracto, y anacardo manzana extracto contra Enterococcus faecalis y Candida albicans. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando la prueba de difusión en agar. Las soluciones se dividieron en cuatro grupos: Grupo I: extracto de hoja de guayaba, Grupo II, extracto de A. vera, y Grupo III, extracto de hoja de papaya, y Grupo IV, extracto de anacardo. Se registraron las zonas de inhibición del crecimiento. Las cepas utilizadas para este estudio fueron E. faecalis ATCC 29212 y C. albicans ATCC 90028. El hipoclorito de sodio había demostrado los mejores resultados entre las soluciones probadas. Entre los extractos de hierbas, anacardo manzana extracto y hoja de guayaba extracto habían mostrado actividad estadísticamente significativa contra E. faecalis y C. albicans.[16]

Nirwana I, et al. (2018) En su investigación titulada actividad antibacteriana de hoja de parra (*Ficus carica* Linn.) contra *Enterococcus faecalis* y sus efectos de citotoxicidad en fibroblastos. Tuvo como objetivo determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de hoja de parra (*F. carica* Linn.) contra *E. faecalis* y su citotoxicidad sobre fibroblastos in vitro. Se usó el método de dilución en serie para determinar el CMB del extracto sobre *E. faecalis* que creció en medio de agar nutritivo. La inoculación se llevó a cabo en concentraciones que sospechaban una concentración inhibitoria mínima CIM y CMB, concentración entre CIM y MBC, y grupos de control en agar nutritivo diferente. MIC y MBC del extracto contra E. faecalis fueron conocidos al contar el crecimiento de colonias de bacterias en medios de agar nutritivos en UFC/ml. La citotoxicidad de CIM y CMB del extracto adquirido se ensayaron usando 3 - (4,5-dimetiltiazol-2-il) ensayo -2,5-difeniltetrazolio, y los resultados se leyeron usando un lector de ELISA. Datos de las colonias de *E. faecalis* se analizaron utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. El resultado mostró una diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$). El extracto a una concentración del 50% no mostró crecimiento bacteriano, y la viabilidad celular a esta concentración fue del 77,7%. El extracto de *Ficus carica* tiene un efecto

antibacteriano en *E. faecalis* con CMB al 50% y no es citotóxico para los fibroblastos.[17]

Aigaje, et al. (2017). En su investigación titulada actividad antibacteriana de *Minthostachys mollis* frente a *Porphyromonas gingivalis*. Su objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de *Minthostachys mollis*, un arbusto perenne de la Serranía Ecuatoriana, frente a *Porphyromonas gingivalis* que es uno de los principales periodontopatógenos. Fue un estudio de tipo experimental, prospectivo, transversal, in vitro, para lo cual se elaboró un aceite esencial utilizando la técnica de destilación por arrastre de vapor de agua. A partir del aceite obtenido se prepararon las concentraciones de 25%, 50% y 100%. Se utilizaron Clorhexidina al 0,12% y Ampicilina de 10 µg como control positivo y agua como control negativo. El análisis de datos se realizó mediante las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y Mann Whitney. La efectividad antibacteriana en la concentración al 25% obtuvo un halo promedio de 11,2 mm, al 50% alcanzó una media de 9,6 mm y al 100% fue de 13,6 mm siendo esta la más efectiva. Concluyeron que la clorhexidina al 0,12 y la ampicilina de 10 µg, tienen mejor efecto antibacteriano que el aceite esencial de *Minthostachys mollis.*[18]

Hajimaghsoodi S, et al. (2016). En su investigación titulada, comparación de laboratorio de los efectos antibacterianos del extracto de menta verde y el hipoclorito de sodio sobre las bacterias *Enterococcus faecalis*. Su objetivo fue comparar el efecto antibacteriano del extracto de menta verde sobre las bacterias *Enterococcus faecalis* con el del hipoclorito de sodio 5,25%. El medio utilizado fue agar sangre de carnero al 5%. Las dos soluciones utilizadas, incluido el hipoclorito de sodio al 5,25% y los extractos de menta, se colocaron adyacentes a *Enterococcus faecalis*. Se utilizaron dos grupos, cada uno con 10 muestras, con un total de 20 muestras. Los discos, incluida cada solución, se colocaron a 2 cm de distancia en una placa que contenía el medio de cultivo y las bacterias. La placa se incubó posteriormente a 37ºC durante 48 horas. Después de la incubación, se midió y comparó el diámetro medio del halo alrededor de cada disco, que representa la falta de crecimiento bacteriano, utilizando una regla. El disco de penicilina se utilizó para el control positivo y un disco en blanco estéril que contenía suero fisiológico se utilizó como control negativo. Este proceso se

repitió 10 veces para cada solución. Los datos se analizaron en el software estadístico SPSS 17 utilizando la prueba t. Los resultados mostraron que el diámetro medio de halo en el grupo de extracto de menta verde era cero y en el grupo de hipoclorito de sodio era de 23,7 mm. Hubo una diferencia significativa entre el diámetro medio de la falta de halo de crecimiento del extracto de menta verde y el de hipoclorito de sodio al 5.25% en bacterias Enterococcus faecalis ($p \leq 0.001$). Teniendo en cuenta las limitaciones de un estudio experimental, parece que el extracto de menta verde no tiene ningún efecto antibacteriano contra la bacteria *Enterococcus faecalis*, en contraste con el hipoclorito de sodio 5,25%.[19]

Torrenegra M. et al. (2016). En su investigación titulada composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial *Minthostachys mollis*. Su objetivo fue evaluar la composición química y la actividad antibacteriana del aceite esencial Minthostachys mollis cultivado en el departamento de Norte de Santander, Colombia. El aceite esencial fue obtenido por hidrodestilación convencional, a partir de las hojas. La actividad antibacteriana se evaluó sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Para determinar la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria, los aceites se diluyeron hasta la concentración deseada (1000–50 μg/mL) empleando el método de microdilución en caldo, y se empleó el lector de microplacas para la cuantificación del crecimiento bacteriano. Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron que las bacterias fueron sensibles al aceite esencial de *Minthostachys mollis*; además, este aceite presentó un elevado contenido de monoterpenos oxigenados con reconocida actividad antibacteriana, como son el carvacrol y el timol. En función de los resultados obtenidos, concluimos que la especie vegetal evaluada es promisoria para el control del componente bacteriano.[20]

Rojas J. et al. (2016). En su investigación titulada actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L, *Origanum vulgare* L y *Minthostachys mollis* en combinación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) de aislamientos clínicos. Su objetivo fue determinar la actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L, *Origanum vulgare* L y *Minthostachys mollis* en combinación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre

Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA) de aislamientos clínicos. Los aislamientos clínicos de SARM se obtuvieron del Hospital Nacional "Dos de Mayo" en Lima, Perú. La actividad inhibidora en MRSA se determinó mediante el método de difusión en disco y la concentración inhibidora mínima (MIC) mediante el método colorimétrico de microdilución en placas de 96 pocillos. Los principales componentes de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* fueron pulegona (33.48%) y menthone (26.68%). El *Thymus vulgaris* presentó diámetros de halo de inhibición de 32.23 mm y *Thymus vulgaris* + EDTA de 32.47 mm, ambos significativamente más altos que 30 µg de cefoxitina (Halo de inhibición de 17.60 mm). La MIC de *T. vulgaris* contra MRSA fue de 0.57 µg/mL. Este estudio mostró que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* tenía actividades antibacterianas contra S. aureus MRSA e indica su posible aplicación en el control de este patógeno. El aceite esencial de *M. mollis* no presentó efecto antibacteriano.[21]

Huari G. (2014). En su investigación titulada efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre *Streptococcus mutans*. Su objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* en *Streptococcus mutans*. Se realizó las pruebas de susceptibilidad para lo cual se prepararon diluciones del aceite esencial. Se utilizaron discos de papel de filtro estériles que fueron embebidos con 10 µL del aceite esencial de muña al 100 %, otros discos se prepararon con aceite esencial de muña al 50 % y 25 %. El solvente utilizado fue dimetilsulfóxido (DMSO) y fue utilizado como control negativo. Como control positivo se utilizaron discos de amoxicilina. La medición de los halos de inhibición se realizó con vernier. Los resultados mostraron que el aceite esencial de Minthostachys *mollis* al 100% tuvo un halo promedio de 10.79 mm, al 50 % fue de 7.6 mm, y al 25 % no hubo efecto (al igual que el control negativo). El control positivo (amoxicilina) tuvo un halo promedio de 49.3 mm. Se concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % tiene menor efecto antibacteriano que la amoxicilina.[22]

Ccallo S. (2013). En su investigación titulada efecto inhibitorio del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (muña) sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Su objetivo fue determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (muña) sobre

Streptococcus mutans y *Porphyromonas gingivalis*. Se utilizó el método de microdilución. Los resultados mostraron que la concentración mínima inhibitoria para Streptococcus mutans es 0.448 g/ml de aceite esencial, ya que la concentración inhibe el 50% del crecimiento bacteriano y para Porphyromonas gingivalis es mayor a 0.448 g/ml de aceite esencial, ya que es la mayor concentración en la que se trabajó y solo se inhibió el 23.05 % de crecimiento bacteriano. Se concluye que el aceite esencial de muña inhibe a *Streptococcus mutans* y a *Porphyromonas gingivalis.*[23]

1.3. Teorías relacionadas al tema

1.3.1. Endodoncia

La Endodoncia es una especialidad de la Odontología, reconocida como tal por la Asociación Dental Americana en 1963, que estudia la estructura, morfología y fisiología de las cavidades dentarias coronal y radicular, que contienen la pulpa dental y a su vez, trata las afecciones del complejo dentinopulpar y de la región periapical. Los avances en esta ciencia, las técnicas de asepsia y los principios de preparación, así como obturación de conductos radiculares han permitido incrementar las tasas de éxito del tratamiento endodóntico, sobre todo en los dientes, en los que se logra buen sellado apical; sin embargo, aún se enfrentan problemas que derivan en retratamientos, en dependencia sobre todo de variaciones anatómicas y otras condicionantes que complican la terapia. El criterio cada vez más conservacionista de la estructura dentaria establece un incremento en la demanda de este tratamiento, por lo que este debe ser provisto de un modo predecible, con el objetivo de optimizar el potencial reparativo y favorecer el éxito.[24]

Los estomatólogos pueden asegurar un tratamiento de la más alta calidad; para ello deberán lograr la planificación coherente del caso, evaluar con objetividad la dificultad que se presenta en el curso de la terapia, consciente de la pericia y habilidad personal que se requiere para enfrentar tratamientos complejos. La certeza en la consideración del pronóstico redundará en la selección apropiada de los pacientes necesitados de

tratamiento endodóntico y en una mayor satisfacción de ellos con la asistencia estomatológica que se brinda.[25]

1.3.1.1. Fracaso del tratamiento endodóntico

Uno de los principios básicos que hacen a la práctica de la endodoncia es mantener una ética profesional dirigida a canalizar todos los esfuerzos en lograr que se mantenga un éxito del tratamiento sustentable en el tiempo a corto, mediano y largo plazo. El advenimiento de una odontología cada vez más compleja, con un criterio más conservacionista de las estructuras dentales, el aumento del promedio de vida de la población en general, sumado al requerimiento estético de los pacientes, han producido un fuerte incremento de la demanda de tratamientos endodónticos condicionada a factores sociales y económicos.[26]

Esta situación ha llevado al clínico a afrontar condiciones más difíciles de los dientes a tratar, con un aumento paralelo de complicaciones para resolver las diversas situaciones. Ha sido postulado que un correcto tratamiento endodóntico está basado en una tríada de factores que se relacionan entre sí y que incluyen el acceso, la preparación y la obturación radicular. Estos factores no son suficientes para lograr el éxito, pues deben ser complementados por la irrigación, la medicación intraconducto, cuando el caso lo requiera y un buen sellado coronario temporal y definitivo mediante una adecuada rehabilitación de la pieza dentaria con la finalidad de restituir su función.[27]

El éxito o fracaso final de la terapéutica de conductos puede ser debido a varios factores. Para la revisión y evaluación clínica del diente tratado mediante endodoncia, se deben considerar los fracasos debidos a la condición pulpo-periapical previa, relacionados con la compleja anatomía del diente y los sistemas de conductos, concernientes a la técnica del tratamiento. Frente a todos los factores que pudieran afectar la terapia, se reconocen los aspectos anatómicos como los de más difícil

control, por lo que resulta importante que el odontólogo conozca a cabalidad la anatomía del diente a tratar y sus posibles variaciones.[28]

1.3.1.2. Presencia de microorganismos en el fracaso del tratamiento endodóntico

La persistencia de la infección es la causa principal del fracaso de conductos obturados pues los microorganismos pueden permanecer dentro de los túbulos dentinarios, en lagunas del cemento radicular, en las foraminas apicales y en las lesiones periapicales. Incluso en muchas lesiones patológicas periapicales un gran número de microorganismos persisten a pesar de haber recibido medicación intraconducto.[29]

La microflora endodóntica es abundante con diferentes tipos de microorganismos inclusive diferenciados en el tercio apical del conducto radicular y asociados a lesiones perirradiculares, cuya presencia sugiere que podrían ser la causa de las mismas. También existe una correlación entre la persistencia de la infección microbiana en el conducto radicular y la presencia de una rarefacción perirradicular preoperatorio en los fracasos endodónticos.[30]

La mayoría de los cambios que se producen en el tejido pulpar y periapical son de origen microbiano y deben ser tratados como lesiones infecciosas. El clínico debe priorizar su esfuerzo en la eliminación de los microorganismos mediante la instrumentación, la irrigación y la medicación intraconducto. Existe una controversia entre terminar el tratamiento en una o varias citas. Sin embargo, la flora microbiana localizada en áreas inaccesibles del sistema de conductos no puede ser removida eficazmente mediante los sistemas de instrumentación e irrigación actuales, lo que demuestra la importancia de la medicación intraconducto con la finalidad de reducir la microbiota intrarradicular. Es importante remarcar el tiempo necesario para que esta medicación ejerza su acción.[31]

1.3.2. Modelo Teórico Celular de *Enterococcus faecalis*

Los enterococos son cocos gram positivos, que se encuentran aislados, en pares, o formando cadenas cortas. Son catalasa negativa, anaerobios facultativos, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas. Las características bioquímicas sobresalientes incluyen: la habilidad de crecer en presencia de NaCl al 6,5%, a temperaturas entre 10°C y 45°C, y hasta en un pH de 9,6. Las especies de enterococos clínicamente importante son: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, entre otras. *E. faecalis* es el patógeno humano más frecuente representando el 60% al 90% de los aislamientos clínicos de enterococos. *E. faecium* es la segunda especie aislada en frecuencia, representando el 5% al 16% de los aislamientos clínicos.[18]

1.3.2.1. Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*

Si bien los primeros reportes referentes a la patogenicidad de los enterococos se remontan a fines del siglo XIX, lo cierto es que estos microorganismos han manifestado su mayor trascendencia clínica en los años más recientes, merced a su inusitada y aún creciente incidencia en las infecciones intrahospitalarias. Entre los principales motivos de su etiología se cuentan la relativa tolerancia del microorganismo a la acción antibacteriana de detergentes y antisépticos considerados en los programas de limpieza intrahospitalaria y, sobre todo, su sorprendente eficacia para adquirir y compartir material genético asociado a mayor virulencia y/o a multirresistencia.[32]

Numerosas cepas de enterococos han evolucionado hasta desarrollar una plena tolerancia a los antibióticos β-lactámicos, aminoglucósidos y quinolónicos y, en respuesta a ello, los equipos de salud se han visto obligados a utilizar continuamente vancomicina, glucopéptido al cual - por motivos estratégicos - sólo debía recurrirse para combatir los casos especiales de resistencia. En consecuencia, hoy se reporta constantemente cepas VRE (por vancomycin-resistant Enterococcus), constituyéndose en un problema de salud pública mundial que puede llevar a la era anterior a la del descubrimiento de los antibióticos.[33]

1.3.2.1.1. Sustancia de agregación (AS)

La mayoría de las investigaciones sobre este particular se ha enfocado en una sola molécula, conocida como sustancia de agregación (AS), cuyo papel aparenta ser decisivo en la patogenia. La AS es una proteína superficial codificada principalmente por el plásmido pAD1, específicamente por el gen asa1, cuya presencia incrementa considerablemente la adherencia e internalización enterocócica en los macrófagos, previa interacción con las integrinas CD11b, CD18 y CR3, presentes también en otras células de defensa del humano. En concreto, la sustancia de agregación (AS) desempeña las siguientes funciones: Potenciación de la conjugación de plásmidos, Adhesión a los tejidos del hospedero, Promoción de la internalización y la supervivencia en los fagocitos.[34]

1.3.2.1.2. Potenciación de la conjugación de plásmidos

Uno de los rasgos más característicos del género *Enterococcus* radica en la eficacia con la que lleva a cabo la conjugación plasmídica; el proceso inicia cuando un clon que funge como potencial receptor libera al medio ciertos péptidos, denominados feromonas, que promueven la aproximación de enterococos hacia ella y la secuencial transferencia de diversos plásmidos provenientes de las células bacterianas capaces de actuar como donadoras.[35]

Un clon enterocócico que ya posee un determinado plásmido no elabora la feromona homóloga correspondiente, pero continúa sintetizando y excretando otras que inducen su apareamiento con las células que cuentan con moléculas plasmídicas de las que aquélla carece. Entre los plásmidos inducibles por las feromonas, destacan el pCF10 que confiere resistencia a la tetraciclina y, desde luego, el pAD1, uno de los principales productores de AS la cual, entre otras funciones, suele participar precisamente en la formación

de agregados constituidos por células donadoras y receptoras, para facilitar e intensificar la transferencia plasmídica.[35]

La transferencia de plásmidos bacterianos implica cuatro pasos críticos: El contacto directo entre las células donadora y receptora, la formación de un canal que permite la transferencia del DNA entre ellas, el desplazamiento del plásmido o del segmento de DNA a través de dicho canal, la estabilización del DNA plasmídico en el nuevo huésped, ya sea por replicación autónoma o mediante su inserción en el genoma.[36]

En los enterococos, la unión de una a cinco moléculas de feromonas a la superficie de la célula donadora, induce un proceso de transmisión de señales que da como resultado la expresión de distintos genes relacionados con la transferencia de plásmidos. Sin lugar a dudas, el sistema de feromonas asociado a la transferencia de plásmidos aporta una gran ventaja a los enterococos: un determinado plásmido no es movilizado, excepto cuando existe una bacteria potencialmente receptora que no lo posee; de esta manera, ocurren una óptima conservación energética y la mayor adaptabilidad ambiental del género al nicho ecológico que coloniza.[37]

1.3.2.1.3. Promoción de la internalización y la supervivencia en los fagocitos.

En las numerosas infecciones endógenas debidas a enterococos, es determinante el papel de los macrófagos, los cuales suelen fungir como vehículos responsables de la translocación del microorganismo, desde el intestino hasta el sistema linfático o el torrente circulatorio del individuo involucrado. Diversos hallazgos apuntan hacia la AS, como la promotora de que los enterococos se adhieran a los fagocitos, penetren en ellos, e inclusive, sobrevivan intracelularmente. La presencia del gen asa1 incrementa la eficacia de la adherencia a macrófagos. En cuanto a la internalización,

existe la influencia de dos moléculas codificadas por el plásmido pCF10: la sustancia de agregación Asc10 y la proteína Sec10.[38]

1.3.2.1.4. Hemolisina

La citolisina de *E. faecalis* destruye células eucariotas y procariotas. Dicha sustancia desempeña un papel importante durante la primera fase de la infección por enterococos la cual, aun cuando es asintomática, implica la penetración bacteriana en los tejidos intestinales humanos, así como una toxemia y cierto daño tisular que antecede a la segunda fase, en la que ocurre la manifestación de los principales síntomas. La citolisina enterocóccica también está codificada por el plásmido pAD1 y se constituye por tres subunidades, mismas que interactúan para provocar la lisis celular. Desempeña relevantes funciones patogénicas: actúa como toxina, provocando la ruptura del sistema membranoso de los glóbulos rojos y de diversas células humanas.[39]

1.3.2.1.5. Gelatinasa

Es una enzima capaz de degradar a la gelatina, caseína, hemoglobina y a ciertos péptidos bioactivos, incluidas las feromonas quimiotácticas de *E. faecalis*, las cuales promueven la llegada de neutrófilos a los tejidos colonizados por el microorganismo; en tal sentido, una de las posibles funciones de esta proteasa podría consistir en modular o modificar, junto con las feromonas quimiotácticas, la defensa del hospedero, induciendo alternativamente la ausencia o la acumulación de leucocitos en los tejidos colonizados.[40]

1.3.3. Modelo teórico *Minthostachys mollis* (muña)

Minthostachys spp es una planta que se encuentra ampliamente distribuida en nuestro país y presenta cuatro tipos de variedades conocidas: Minthostachys andina, Minthostachys mollis, Minthostachys setosa y Minthostachys tormentosa. Suele ser utilizada para preparar infusiones, decocciones, aceites y como condimento en distintas preparaciones.

Asimismo, es reconocida por su alto contenido de calcio 2,237 mg en 100 g de la parte comestible de la planta. Sin embargo, en la actualidad no existen estudios que demuestren el grado de facilidad de absorción (biodisponibilidad) del calcio de la muña.[20]

En el Perú existen 5 mil plantas identificadas botánicamente. Dentro de las de consumo habitual se encuentra la muña (Minthostachys spp). Taxonómicamente pertenece al orden de Lamiales Bromhead, la familia de Lamiaceae Martinov, el género de Minthostachys (Benth.) Spach y tiene diferentes especies. "Muña" es su denominación común en el Perú. Tradicionalmente se usa en infusiones, y decocciones, así como para elaborar aceites y harina. También es reconocida por sus diversas propiedades medicinales, entre ellas el alivio del dolor de estómago y el combate de los parásitos intestinales y sus propiedades nutricionales, pues su contenido de calcio bordea los 2,237 mg. Hojas, tallos y flores son las partes de la muña que se utilizan en preparaciones como tisanas, sopas y otras. El análisis fitoquímico de hojas de Minthostachys mollis (Kunth) se evidencio la presencia de esteroides en el extracto diclorometánico; compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides en el extracto metanólico; y, saponinas, taninos, flavonoides y leucoantocianidinas para el extracto acuoso.[21]

1.4. Formulación del Problema.

¿Cuál es la diferencia del efecto antibacteriano *in vitro* entre extracto hidroetanólico y extracto acuoso de *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212?

1.5. Justificación e importancia del estudio.

Las infecciones radiculares que han tenido tratamiento fallidos y el responsable es el Enterococcus faecalis a través de sus factores de virulencia, en varias ocasiones es imposible su erradicación, asimismo influye en la proliferación de otros microorganismos anaeróbicos, formando biopelículas.

Asimismo, los extractos vegetales, a través de diversos estudios han evidenciado tener capacidad antibacteriana, como también han identificado componentes

antibacterianos tener capacidad inhibitoria sobre diferentes microorganismos, aun así no siempre los resultados de las investigaciones son coincidentes, lo que sugiere que existe una relación entre el efecto del extracto y las especies de vegetales. En nuestro medio, no existen reportes de trabajos que revelen el efecto inhibitorio de la "Minthostachys mollis" procedente de la región Lambayeque sobre Enterococcus faecalis.

Esta situación motiva la ejecución del presente estudio cuyos resultados permitirán determinar si el extracto hidroetanólico de Minthostachys mollis, tiene efecto antibacteriano, teniendo con ello la posibilidad de incentivar otros estudios destinados a demostrar el efecto inhibitorio sobre otros microorganismos tipo parásitos u hongos, la purificación del extracto, a su uso en terapia o como desinfectante.

1.6. Hipótesis.

El extracto hidroetanólico tiene más efecto antibacteriano *in vitro* que el extracto acuoso de Minthostachys mollis contra Enterococcus faecalis ATCC 29212.

1.7. Objetivos.

1.7.1. Objetivo General

Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* entre el extracto hidroetanólico y el extracto acuoso del *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

1.7.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mediante el método de difusión con disco.
2. Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de *Minthostachys mollis* contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mediante el método de difusión con disco.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Tipo y Diseño de Investigación.

La investigación es de tipo cuantitativa, prospectiva y transversal con diseño experimental de estímulo creciente, con grupos controles.[22]

2.2. Población y muestra.

Se realizó un muestreo no probabilístico. La muestra estuvo constituida por 160 unidades experimentales (placas petri) distribuidos en 8 tratamientos. Se consideraron 20 replicaciones por ensayo.

2.3. Variables, Operacionalización.

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES	TÉCNICA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	ESCALA
Variable Independiente: Extracto de *Minthostachys mollis*	Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos.	Hidroetanólico	Concentraciones 15 mg/mL 30 mg/mL 45 mg/mL	Maceración etanólico Ebullición.	De razón
		Acuoso			
Variable Dependiente: Efecto antibacteriano	Propiedades de algunas sustancias químicas que son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación.	Crecimiento de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212	Halo de inhibición Nulo: <= 8 mm Sensible: de 9 a 14 mm Muy sensible: de 15 a 19 mm Sumamente sensible= >20 mm.	Difusión en disco.	Nominal

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

2.4.1. Método de difusión con discos

Método de difusión en agar mitis salivarius con discos es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. (41)

2.4.2. Identificación del espécimen

Se llevó el espécimen incluyendo hojas y flores prensadas en cartulinas de 27 x 42 cm, al herbario del departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Pedro Ruiz Gallo para su identificación y certificación. (Anexo N° 01)

2.4.3. Colección de la muestra.

Para el procedimiento, se siguió la metodología usada por González (42), siendo esta:

1. **De la desinfección**

   Las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) fueron desinfectadas con una torunda de algodón humedecidas con alcohol de 95º.

2. **Del secado**

   Las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) fueron secadas empleando una estufa a una temperatura de 50 °C durante 24 horas.

3. **De la molienda y tamizaje.**

   Las hojas de *Minthostachys mollis* después de ser secadas fueron pulverizadas en seco en una licuadora, obteniéndose el material en polvo para la maceración.

4. **Preparación del extracto acuoso de *Minthostachys mollis*.**
   - Se pesaron 200 g de material pulverizado de *Minthostachys mollis* y se incorporó en 500 mL de agua destilada, fue sometido a ebullición durante 15 minutos.
   - El producto obtenido fue filtrado con papel filtro Whatman N° 40, N° 41, N° 42 y obtuvo un extracto purificado libre de residuos.

- El extracto resultante fue distribuido en placas petri y secado en calor a 50°C hasta sequedad.
- El residuo seco obtenido, fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su utilización.

5. **Preparación del extracto hidroetanólico de *Minthostachys mollis***
   - Se maceraron 200 g de material pulverizado de *Minthostachys mollis* (muña) y se agregaron 500 mL de etanol al 70 % (Hidroetanol) en una botella de vidrio ámbar hermética. Se agitó la botella diariamente durante una semana.
   - El producto fue filtrado con papel filtro Whatman N° 40, N° 41, N° 42, obteniendo un extracto purificado libre de residuos.
   - El extracto resultante fue distribuido en placas petri y fue secado en caliente a una temperatura de 50°C hasta sequedad.
   - El residuo seco obtenido fue guardado en refrigeración a 2 °C en frasco de vidrio color ámbar, hasta su utilización.
6. **Preparación del agente antibacteriano**

   Siguiendo las recomendaciones del CLSI[42], el residuo seco de los extractos obtenidos fue dosificado en mg/mL. El residuo seco del extracto acuoso fue pesado en balanza analítica hasta obtener las concentraciones evaluadas: 15 mg/mL, 30 mg/mL y 45 mg/mL. El extracto acuoso fue resuspendido en agua destilada estéril y el extracto hidroetanólico en etanol al 70º.

7. **Actividad Antibacteriana: Preparación del inóculo**

   Según las orientaciones de la *Clinical and Laboratory Standards Institute*[43].

8. **Colonias para el inóculo**

   La cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 fue reactivada de un cultivo en placa de agar Cerebro Corazón después de 24 horas.[42]

9. **Preparación de la suspensión del inóculo.**

   De la placa con agar, se seleccionaron dos colonias bien aisladas y con el mismo tipo morfológico. La parte superior de cada colonia fue tocará

con un asa y se transfirió a un tubo con 4mL de caldo Müller-Hinton. Con ayuda de un espectrofotómetro se midió la turbidez la cuál fue equivalente a 0,5 del estándar de Mc Farland, con absorbancias de 0,08. La suspensión bacteriana resultante contenía aproximadamente 1,5 x 10^8 UFC/mL.

10. De la Siembra

La siembra del inóculo bacteriano en las superficies de placas de agar mitis salivarius se realizó mediante el método de Kirby Bauer. Para ello un hisopo estéril se sumergen en el inóculo y el exceso de inóculo se elimina presionando el hisopo sobre las paredes del tubo de ensayo, luego se realiza la siembra en superficie en tres sentidos antepuestos para asegurar la distribución uniforme de la bacteria sobre el medio de cultivo. Las placas son colocadas invertidas en estufa a 36.5ºC para su secado antes de incorporar lo discos con los antimicrobianos.

11. Método de difusión con disco

- Se colocaron discos de papel filtro estériles en las superficies de las placas sembradas con el inóculo.
- El diámetro de los discos fue de 6 mm.
- Los discos fueron colocados equidistantes entre sí, a razón de 5 discos por placa. Sobre los discos se colocó 25 µL de cada concentración de *Minthostachys mollis* tanto del extracto acuoso como alcohólico.
- Los discos fueron rotulados para cada concentración evaluada, se selló con parafilm y se incubaron las placas a 36.5°C, por un periodo de 24 horas.

12. Lectura e interpretación de resultados

Después de 24 horas de incubación, cada placa fue examinada. Los halos de inhibición formados fueron medidos con ayuda de un vernier metálico de marca Mitutoyo y serán expresados en milímetros y fueron interpretados según orientaciones del CLSI (Clínical Laboratory Estándar Institute).

La actividad inhibitoria se consideró en función al diámetro del

HICM: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

2.5. Procedimientos de análisis de datos.

Para determinar la relación del efecto antibacteriano del extracto acuoso e hidroetanólico de *Minthostachys mollis* en el crecimiento bacteriano se realizó análisis de varianza. Para el análisis estadístico se aplicó pruebas estadísticas paramétricas Anova y Tunkey a través del paquete estadístico SPSS v. 22; A. 2013; País de origen Chicago.

2.6. Aspectos éticos.

Se considerarán aspectos de bioseguridad, con respecto a su inactivación de los medios de cultivo con *Enterococcus faecalis*, mediante autoclavado a una temperatura de 121 °C a 1 atm de presión durante 15 minutos, con la finalidad de evitar su propagación en el personal de mantenimiento.

2.7. Criterios de Rigor Científicos

La presente investigación se desarrolló aplicando la metodología estandarizada del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Para el presente estudio se tomará en cuenta la ficha de recolección de datos en relación a número de repetición, con la finalidad de tener una consistencia interna del efecto antibacteriano de los extractos de *Minthostachys mollis.*

Para la medición de los halos inhibición de crecimiento bacteriano, se empleó el calibre o pie de rey VERNIER, con la finalidad de reducir los errores de medida en milímetros (mm).

III. RESULTADOS

3.1. Tablas y Figuras

Tabla 1.

ANOVA *Para determinar la comparación del efecto antibacteriano in vitro entre extracto hidroetanólico y extracto acuoso del Minthostachys mollis contra Enterococcus faecalis ATCC 29212.*

Fuente de Var.	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Factor	Sig.
Tratamientos	7	320.037	45.720	1566.308	0.000
Error	152	4.437	0.029		
Total	159	324.473			

Fuente: Base de datos

En la tabla 01: se observa que al aplicar las pruebas de ANOVA; que entre los 8 tratamientos en estudio hubo diferencias significativas en su capacidad inhibitoria frente a *Enterococcus faecalis*. De ello podemos deducir que los extractos acuoso e hidroetanólico de *Minthostachys mollis*, tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Enterococcus faecalis*.

Tabla 2.

Determinar *efecto antibacteriano in vitro de las concentraciones de 15mg/mL, 30 mg/mL y 45 mg/mL del extracto hidroetanólico y extracto acuoso del Minthostachys mollis contra Enterococcus faecalis ATCC 29212 mediante el método de difusión en disco.*

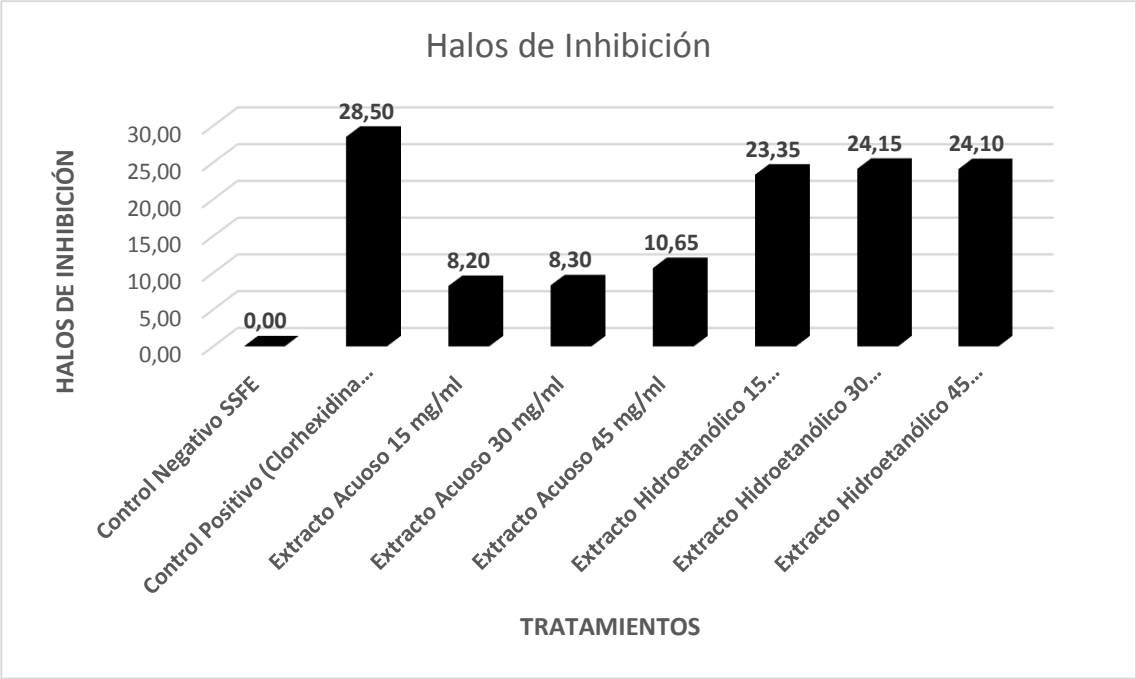
		Halos de Inhibición				
HSD Tukey[a,b]						
				Subconjunto		
Tratamientos en estudio	**N**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Testigo	20	1.0000				
Extracto Acuoso 15mg/ml	20		3.0280			
Extracto Acuoso 30mg/ml	20		3.0440			
Extracto Acuoso 45mg/ml	20			3.4105		
Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	20				4.9320	
Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	20				5.0095	
Extracto Hidroetanólico 30 mg/ml	20				5.0125	
Clorhexidina 2%	20					5.4295

Fuente: Base de datos

En la tabla 2 se observa que resultados de la prueba de Tukey ($p < 0.05$), para determinar el efecto inhibitorio de los extractos acuosos e hidroetanólico de *Minthostachys mollis*; todas las concentraciones tuvieron el mismo efecto inhibitorio sobre *enterococcus faecalis* estadísticamente hablando (halos de inhibición en la concentración hidroetanólico promedio de 23,35 mm, 24,10 mm y 24,15 mm respectivamente). Por ello se agrupan en un solo subconjunto.

En el extracto acuoso las concentraciones de 15 mg/ml y 30 mg/ml tuvieron efecto estadísticamente similar (halo de inhibición de 8,25 mm y 8,30 mm respectivamente), por eso se ubican alineados en el mismo subconjunto mientras que la concentración de 45 mg/ml tuvo un efecto antibacteriano diferente a las anteriores estadísticamente hablando (halo de inhibición promedio de 10,65 mm).

Grafico 01. Prueba de TUKEY para determinar el efecto inhibitorio de los extractos acuoso e hidroetanólico del *Minthostachys mollis* frente a *Enterococcus faecalis*



3.2. Discusión de resultados

Los resultados obtenidos en la presente investigación se relacionan a los reportados por Aigaje, et al.[12] quienes determinaron la actividad antibacteriana de *Minthostachys mollis* frente a *Porphyromonas gingivalis*. Encontrando que a la concentración al 25% el halo de inhibición promedio fue de 11,2 mm, al 50% alcanzó una media de 9,6 mm y al 100% fue de 13,6 mm siendo esta la más efectiva. Concluyeron que la clorhexidina al 0,12 tiene mejor efecto antibacteriano que el aceite esencial de *Minthostachys mollis.* Si bien es cierto el microorganismo evaluado por Aigaje fue diferente; tanto *Porphyromonas gingivalis* como *Enterococcus faecalis* son microorganismos con comportamientos semejantes en la boca. Además, se observa que la clorhexidina tuvo mayor efecto que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* similar a lo observado en el presente estudio, que a pesar que el extracto alcohólico de *Minthostachys mollis* mostró efecto antibacteriano, dicho efecto no pudo superar al control Gluconato de clorhexidina al 2%.

Por su parte Torrenegra M. et al.[13] evaluaron la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial *Minthostachys mollis*. Los resultados de la prueba de sensibilidad mostraron que las bacterias fueron sensibles al aceite esencial de *Minthostachys mollis*; además, este aceite presentó un elevado contenido de monoterpenos oxigenados con reconocida actividad antibacteriana, como son el carvacrol y el timol. Estos resultados ayudan a confirmar los encontrados en el presente estudio, pues se demuestra que los productos vegetales de *Minthostachys mollis* como los extractos y aceites esenciales tienen principios bioactivos con capacidad antibacteriana.

Así mismo, Rojas J. et al.[14] determinaron la actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Minthostachys mollis* y otras plantas en combinación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) de aislamientos clínicos. Reportando que el aceite esencial de *M. mollis* no presentó efecto antibacteriano. Este resultado difiere al obtenido por Torrenegra y en esta investigación y esto se pudo deber a que el

microorganismo evaluado por Rojas es una bacteria resistente a los antibióticos, lo que significa que tiene más mecanismo de evasión a la acción de los antimicrobianos y por ello posiblemente no se observó efecto alguno.

Por otra parte, Huari G, [15] evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* en *Streptococcus mutans*. Sus resultados mostraron que el aceite esencial de Minthostachys *mollis* al 100% tuvo un halo promedio de 10.79 mm, al 50 % fue de 7.6 mm, y al 25 % no hubo efecto. El control positivo (amoxicilina) tuvo un halo promedio de 49.3 mm. Concluyó que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* al 100 % tiene menor efecto antibacteriano que la amoxicilina. Estos resultados se relacionan parcialmente a los obtenidos en la presente investigación pues se muestra que el efecto antibacteriano del aceite esencial reportado por Huari es muy bajo a comparación de la amoxicilina utilizado como control positivo a pesar de haber utilizados concentraciones porcentuales elevadas. Dichos resultados son semejantes al obtenido con el extracto acuoso en esta investigación, que mostraron halos de inhibición menor a 10 mm.

Ccallo S, [16] determinó la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* sobre *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*. Demostró que la concentración mínima inhibitoria para *Streptococcus mutans* es 0.448 g/ml de aceite esencial, ya que la concentración inhibe el 50% del crecimiento bacteriano y para *Porphyromonas gingivalis* es mayor a 0.448 g/ml de aceite esencial, ya que es la mayor concentración en la que se trabajó y solo se inhibió el 23.05 % de crecimiento bacteriano lo cual confirma que los principios activos de *Minthostachys mollis* .Independientemente de si se obtienen a partir del aceite esencial o extracto tienen actividad antibacteriana comprobada sobre diferentes tipos de bacterias, lo que le da la posibilidad a esta planta de seguir siendo estudiada para su potencial uso en odontología, ya sea a través de sus productos totales como aceites esenciales, extractos acuosos o extractos obtenidos con diferentes solventes orgánicos o también mediante la purificación y separación de sus principios activos.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

1. El extracto que mostro el mayor efecto inhibitorio contra el *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, fue el extracto hidroetanólico a una concentración 45 mg/mL con un valor promedio de inhibición de 24.15 mm.
2. Según los resultados obtenidos, el tratamiento usando extracto hidroetanólico que mostro el valor más alto de inhibición fue el de 45mg/mL con un valor de 24.15 seguido de los tratamientos con concentraciones de 30 mg/mL, 15 mg/mL con valores promedio de inhibición de 24.10 y 23.35 respectivamente.
3. Según los resultados obtenidos, el tratamiento usando extracto acuoso que mostro el valor más alto de inhibición fue el de 45mg/mL con un valor de 10.65 seguido de los tratamientos con concentraciones de 30 mg/mL, 15 mg/mL con valores promedio de inhibición de 8.3 y 8.25 respectivamente.

4.2. Recomendaciones

1. Evaluar la efectividad antibacteriana de extractos de *Minthostachys mollis* obtenidos con otros solventes y sobre otras bacterias de interés estomatológico.

2. Evaluar el efecto sinérgico o antagónico de los extractos acuoso e hidroetanólico sobre bacterias de interés estomatológico.

3. Difundir los resultados de la presente investigación a fin de que se pueda repetir el estudio bajo otras condiciones de experimentación.

REFERENCIAS

1. OMS| Salud bucodental [Internet]. 2012 [Citado 14 de octubre del 2017]
2. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/
3. Jian-Fang H, Wei-Dong Z, Wei-Xing C. The analysis of pathogenic microorganism distribution in infected root canal. Biomedical Research. 2017; 28 (12): 5615-5619
4. Vidana R, Rashid MU, Özenci V, Weintraub A, Lund B. The origin of endodontic Enterococcus faecalis explored by comparison of virulence factor patterns and antibiotic resistance to that of isolates from stool samples, blood cultures and food. International Endodontic Journal. 2016; 49: 343–351.
5. Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Pan GS. Biofilms in Endodontics Current Status and Future Directions. Int. J. Mol. Sci. 2017; 18: 1748 - 1761
6. Jiang JEYT, Yan PF, Liang JP. Biological changes of Enterococcus faecalis in the viable but nonculturable state. Genetics and Molecular Research. 2015; 14(4): 14790 – 14801
7. Flores-Encarnación M, Nava-Nolazco RM, Carreño-López R, Aguilar-Gutiérrez GR, García-García SC, Cabrera-Maldonado C. The Antibacterial Effect of Plant-Based Essential Oils. IJRSB. 2016; 4(12): 1 - 5
8. Cancio V, de Carvalho D, Sampaio F, Soares A, Teixeira LM, Oliveira QB, Barcelos R, Gleiser R, Fragoso H, Netto KR, Guimaraes L. Can the Enterococcus faecalis identified in the root canals of primary teeth be a cause of failure of endodontic treatment? Acta Odontologica Scandinavica, 2017; 75(6): 423 – 428
9. Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Parker S, Chiniforush N, Bahador A. The evaluation of cultivable microbiota profile in patients withs econdary endodontic infection before and after photo-activated disinfection. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2017; 18: 198–203
10. Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I. Incidence of virulence determinants in clinical Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium isolates collected in Bulgaria. braz j infect dis 2016; 20(2):127 – 133
11. Zhang C, Du J, and Peng Z. Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. J. Endod. 2015; 41: 1207–1213

12. Arévalo-Híjar L, Aguilar-Luis M, Caballero-García S, Gonzáles-Soto N, Del Valle-Mendoza J. Efectos antibacterianos y citotóxicos de los extractos metanólicos de Moringa oleifera (Moringa) y Azadirachta indica (Neem) contra las cepas de Enterococcus faecalis. Int J Dent. 2018 25 de septiembre; 2018: 1071676. Doi: 10.1155 / 2018/1071676.
13. Charannya S, Duraivel D, Padminee K, Poorni S, Nishanthine C, Srinivasan M. Evaluación comparativa de la eficacia antimicrobiana de nanopartículas de plata y gluconato de clorhexidina al 2% cuando se usa solo y en combinación evaluada utilizando el método de difusión en agar: un estudio in vitro. Contemp Clin Dent. Septiembre de 2018; 9 (supl. 2): S204-S209. doi: 10.4103 / ccd.ccd_869_17.
14. Kiari F, Meddah B, Tir Touil Meddah A. Estudio in vitro sobre la actividad del aceite esencial y el extracto metanólico de la argelina *Nigella sativa* L. Semillas en la cinética de crecimiento de microorganismos aislados de las cavidades bucales de los pacientes periodontales. Saudi Dent J. 2018 oct; 30 (4): 312-323. doi: 10.1016 / j.sdentj.2018.05.011.
15. Kohli D, Hugar S, Bhat K, Shah P, Mundada M, Badakar C. Evaluación comparativa de la susceptibilidad antimicrobiana y la citotoxicidad del extracto de cáscara de *Cocos nucifera* y clorhexidina como soluciones de irrigación contra *Enterococcus Faecalis*, *Prevotella Intermedia* y *Porphyromonas Gingivalis* - Un estudio in vitro. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2018 de abril a junio; 36 (2): 142-150. DOI: 10.4103 / JISPPD.JISPPD_1176_17.
16. Noushad M, Balan B, Basheer S, Usman S, Muhammed Askar M. Eficacia antimicrobiana de diferentes extractos naturales contra patógenos persistentes del canal de la raíz: un estudio in vitro. Contemp Clin Dent. 2018 de abril a junio; 9 (2): 177-181. DOI: 10.4103 / ccd.ccd_754_17.
17. Nirwana I, Rianti D, Soekartono RH, Listyorini R, Basuki D. La actividad antibacteriana de hoja de parra (Ficus carica Linn.) Extraer contra Enterococcus faecalis y sus efectos de citotoxicidad en células de fibroblastos. Veterinario del mundo 2018 Mar; 11 (3): 342-347. doi: 10.14202 / vetworld.2018.342-347.
18. Aigaje-Sierra AI, Zurita-Solís MK. Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de Minthostachys mollis (tipo) al 25, 50, 100 % frente a Porphyromonas gingivalis. Dom. Cien. 2017; 3(1): 3 – 20

19. Hajimaghsoodi S, Un Zandi H, Bahrami M, Hakimian R. Comparación de laboratorio de los efectos antibacterianos del extracto de menta verde y el hipoclorito de sodio sobre las bacterias Enterococcus faecalis. J Dent Biomater. Diciembre 2016; 3 (4): 322-326.
20. Torrenegra-Alarcón M, Granados-Conde C, Durán-Lengua M, León-Méndez G, Yáñez-Rueda X, Martínez C, Pájaro-Castro N. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de Minthostachys mollis. Orinoquia. 2016; 20(1): 69 – 74
21. Rojas J, Ruiz J, Almonacid R, Ortiz J, Palomino M, Huaroto L, Collahua E, Chavez R, and Anampa-Guzmán A. Antibacterial Activities of Essential Oils from Three Medicinal Plants in Combination with EDTA against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. British Microbiology Research Journal. 2016; 17(4): 1-10
22. Huari GM. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) EN Streptococcus mutans [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; 2014
23. Ccallo SN. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del Minthostachys mollis (muña), frente a la actividad bacteriana de Streptococcus mutan y Porphyromonas gingivalis [Tesis]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano, Facultad de Ciencias de la Salud; 2013
24. Sangalli J, Junior E, Bueno C, Jacinto R, Sivieri-Araújo G, Filho J, Cintra LTÂ, Junior E. Actividad antimicrobiana de Psidium cattleianum asociada con hidróxido de calcio contra Enterococcus faecalis y Candida albicans: un estudio in vitro. Clin Oral Investig. Julio de 2018; 22 (6): 2273-2279. doi: 10.1007 / s00784-017-2326-5.
25. Malpartida-Quispe F. En su investigación titulada efecto inhibidor del aceite esencial de Minthostachys mollis (muña) en comparación al paramonoclorofenol alcanforado y gluconato de clorhexidina al 2% frente a cepas de Enterococcus faecalis. Estudio in vitro.[Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima. Perú.2010. Disponible en: http://www.cop.org.pe/bib/tesis/FEDERICOMARTINMALPARTIDAQUISPE.pdf
26. Pinheiro ET1, Mayer MPA. Enterococcus faecalis in Oral Infections. J Interdiscipl Med Dent Sci. 2014; 3(1): 1 – 5

27. Zilm PS, Butnejski V, Rossi-Fedele G, Kidd SP, Edwards S, Vasilev K. D-amino acids reduce Enterococcus faecalis biofilms in vitro and in the presence of antimicrobials used for root canal treatment. Plos One. 2017; 12(2): 1 -14
28. Liceras NV. Alzamora VR. La muña: una gran fuente de calcio. Revista para profesionales de la Salud. 2017: 43: 2 – 18.
29. Castillo EF. Análisis fitoquímico y efecto sinérgico protector de las hojas de Minthostachys mollis y Malva sylvestris sobre la mucosa gástrica de Rattus rattus var. albinus [Tesis]. Trujillo. Universidad Nacional de Trujillo. Escuela de Postgrado. 2010
30. Hernández R, Fernández C, Baptisita P. Metodología de la Investigación. 6ta Edició. Mexico: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2014. 689 p.
31. Clinical and Laboratory Standars Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición. 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8
32. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. 2001; 62(2): 156 – 161
33. Álvarez M. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de Propolis de Apis mellífera (propóleo) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. [Tesis de Grado]. Trujillo, Perú. Universidad Antenor Orrego. 2014. Disponible en: http://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/upaorep/1130/1/%C3%81LVAREZ_MAR%C3%8DA_ANTIBACTERIANO_IN%20VITRO_EXTRACTO.pdf
34. Chrystal J. Estudio de susceptibilidad *in vitro* de *Enterococcus* spp. Rev Chil Infect (2002); 19(2):111-115. Disponible en: http://www.scielo.cl/pdf/rci/v19s2/art09.pdf
35. Garza-Velasco R, Hernández-Acosta K, & Mejía-Chávez A. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de Enterococcus faecalis. Lab-acta 2002; 14, 11-20. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%CDC-Enterococcus.pdf
36. Díaz-Pérez M, Rodríguez-Martínez C, Zhurbenko R. Aspectos fundamentales sobre el género Enterococcus como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. 2010; 48(2):147-161. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032010000200006

37. Pupo S, Díaz A, Castellanos P, Simancas V. Eliminación de *Enterococcus faecalis* por medio del uso de hipoclorito de sodio, clorhexidina y MTAD en conductos radiculares. Av Odontoestomatol [Internet]. 2014; 30(5): 263-270. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852014000500004&lng=es.
38. Armijo-Pérez J. Presencia de *Enterococcus faecalis* en dientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. [Tesis de Grado]. Santigo, Chile. Universidad de Chile. 2011. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/133451/Presencia-de-Entorococcus-faecalis-en-dientes-con-diagn%C3%B3stico-de-periodontitis-apical-asintom%C3%A1tica.pdf?sequence=1
39. Reyes C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. [Tesis de Grado]. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3273/1/Reyes_cc.pdf
40. Ardila C, Maggiolo S, Dreyer E, Armijo J, Silva N. Enterococcus faecalis en dientes con periodontitis apical asintomática. AMC [Internet]. 2014; 18(4):415-423. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552014000400007&lng=es.
41. Pérez S. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanolico de Stevia Rebaudiana sobre Streptococcus mutans ATCC 25175 [Tesis]. Perú: Universidad Nacional De Trujillo, Escuela de estomatología;2013.
42. González AA. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del Amazonas. (Tesis Licenciatura). Manizales, Universidad Nacional de Colombia; 2004.
43. Clinical and Laboratory Standars Institute. Métodos de dilución para determinar la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias que crecen en condiciones aeróbicas. Norma aprobada—octava edición. 2009; (26)2: 1 -100. M07-A8.

ANEXOS

Anexo 1. Certificación de *Minthostachys mollis* (muña)

HERBARIO

PEDRO RUIZ GALLO

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

CONSTANCIA

La directora del herbario PRG de la UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO, que suscribe;

Hace constar:

Que la alumna Arriola García Rosa, ha hecho llegar al herbario PRG 02 muestras botánicas, como parte de su tesis denominada: **Comparación del efecto antibacteriano in vitro entre el extracto hidroetanólico y extracto acuoso de *Minthostachys mollis* "muña" contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212**, las cuales han sido identificadas como *Minthostachys mollis* H.B.K. y registrados con el número 18044.

Lambayeque 20 de noviembre de 2018

M.Sc. Josefa Eduviga Ruiz
Directora

Anexo 2.

Adquisición de Cepa bacteriana de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

UNIVERSIDAD SEÑOR DE SIPÁN

GOBIERNO REGIONAL
Reg. N° 2984 2780
04 OCT 2018

"AÑO DEL DIÁLOGO Y LA RECONCILIACIÓN NACIONAL"

Pimentel, 04 de octubre del 2018

Dr.
RICHARD MONTALVO
JEFE DE LABORATORIO DE LA GERENCIA REGIONAL DE SALUD
GERENCIA REGIONAL DE SALUD

Ciudad:

Chiclayo

Asunto: Agradecimiento por apoyo de cepas

Es grato dirigirme a usted para expresarle el saludo de la EAP de Estomatología de la Universidad Señor de Sipán, la presente carta se le remite en agradecimiento por el apoyo de investigación del Tesista Rosa Flor Arriola García con código universitario N° 2121816457.

Para la realización de su tesis denominada: "**COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* ENTRE EXTRACTO HIDROETANÓLICO Y EXTRACTO ACUOSO DEL** *Minthostachys mollis* **"MUÑA" CONTRA** *Enterococcus faecalis* **ATCC 29212"** por el cual su digna institución facilitó con cepas de *Enterococcus* faecalis para llevar a cabo dicha investigación.

Seguros de seguir contando con su apoyo para futuras investigaciones conjuntas, aprovecho para agradecerle nuevamente las facilidades brindadas y la oportunidad para reiterarle las muestras de mi especial consideración y estima personal.

Atentamente,

UNIVERSIDAD SEÑOR DE SIPÁN SAC

ADMISIÓN E INFORMES
074 481610 - 074 481632
CAMPUS USS
Km. 5, carretera a Pimentel
Chiclayo, Perú

www.uss.edu.pe

Anexo 3. Declaración Jurada especialista en microbiología

DECLARACIÓN JURADA

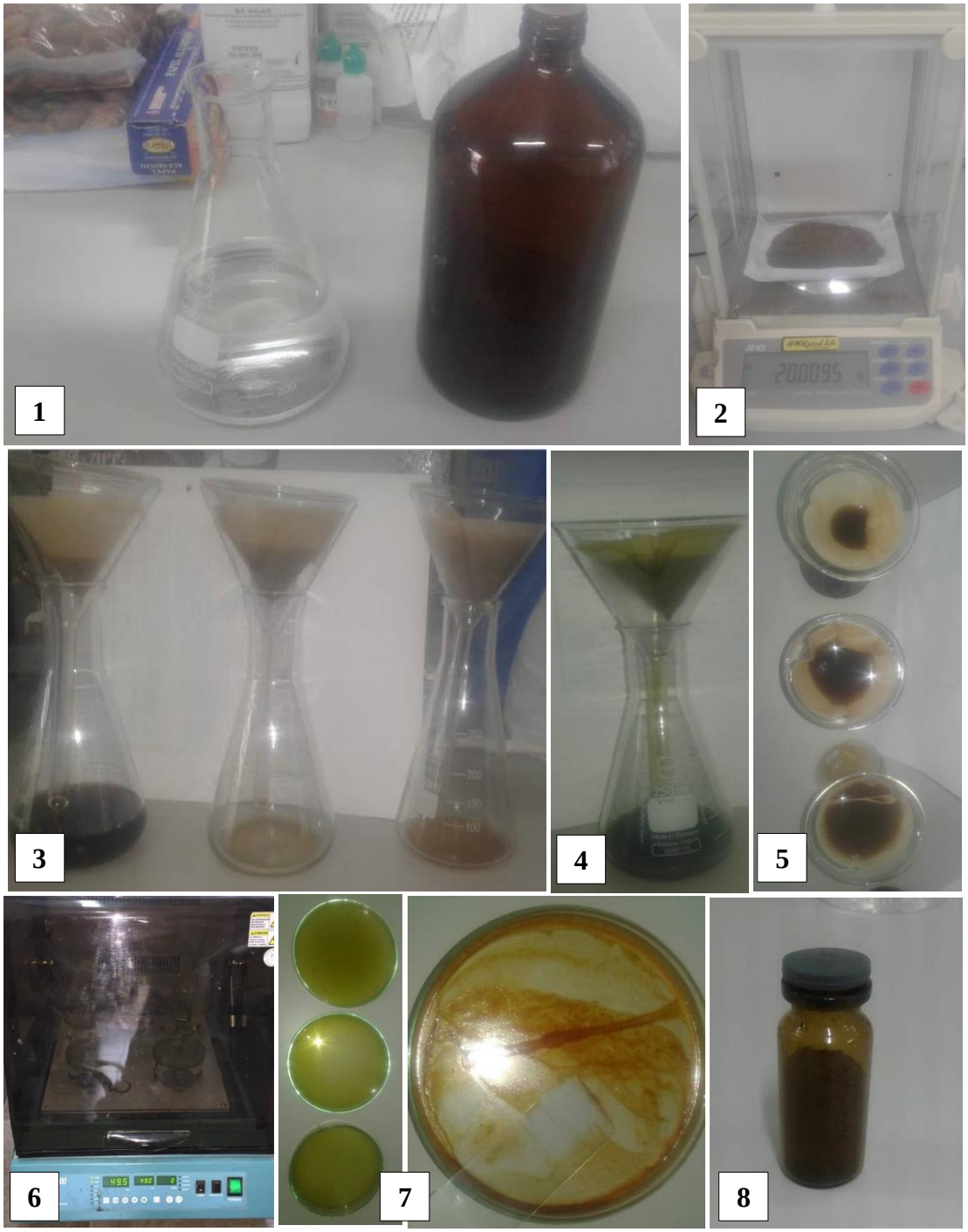
Yo, **MIGUEL ANGEL RUIZ BARRUETO**, de Nacionalidad PERUANA con DNI N° **42814146**, de Profesión **MICROBIÓLOGO** y colegiatura C.B.P N° **8256**, Maestro en Ciencias con mención en Microbiología Clínica y candidato a Doctor en Ciencias Biomédicas, despeñándome actualmente como Docente Ordinario Auxiliar Tiempo Completo y Coordinador de Investigación en la Escuela de Estomatología de la Universidad César Vallejo, Declaro bajo juramento:

Que en mi condición de especialista en el tema he asesorado y supervisado a la Srta. **Rosa Flor Arriola García** en la ejecución de su Proyecto de Tesis titulado: **"COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* ENTRE EXTRACTO HIDROETANÓLICO Y EXTRACTO ACUOSO DE *Minthostachys mollis* (MUÑA) CONTRA Enterococcus faecalis ATCC 29212".**

La ejecución fue solventada por la estudiante y ha sido desarrollada cumpliendo rigurosamente con todos los requisitos Metodológicos y Procedimentales requeridos en el tema en mención. Fue realizada 23 y 24 de octubre del año 2018 en el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo, Piura.

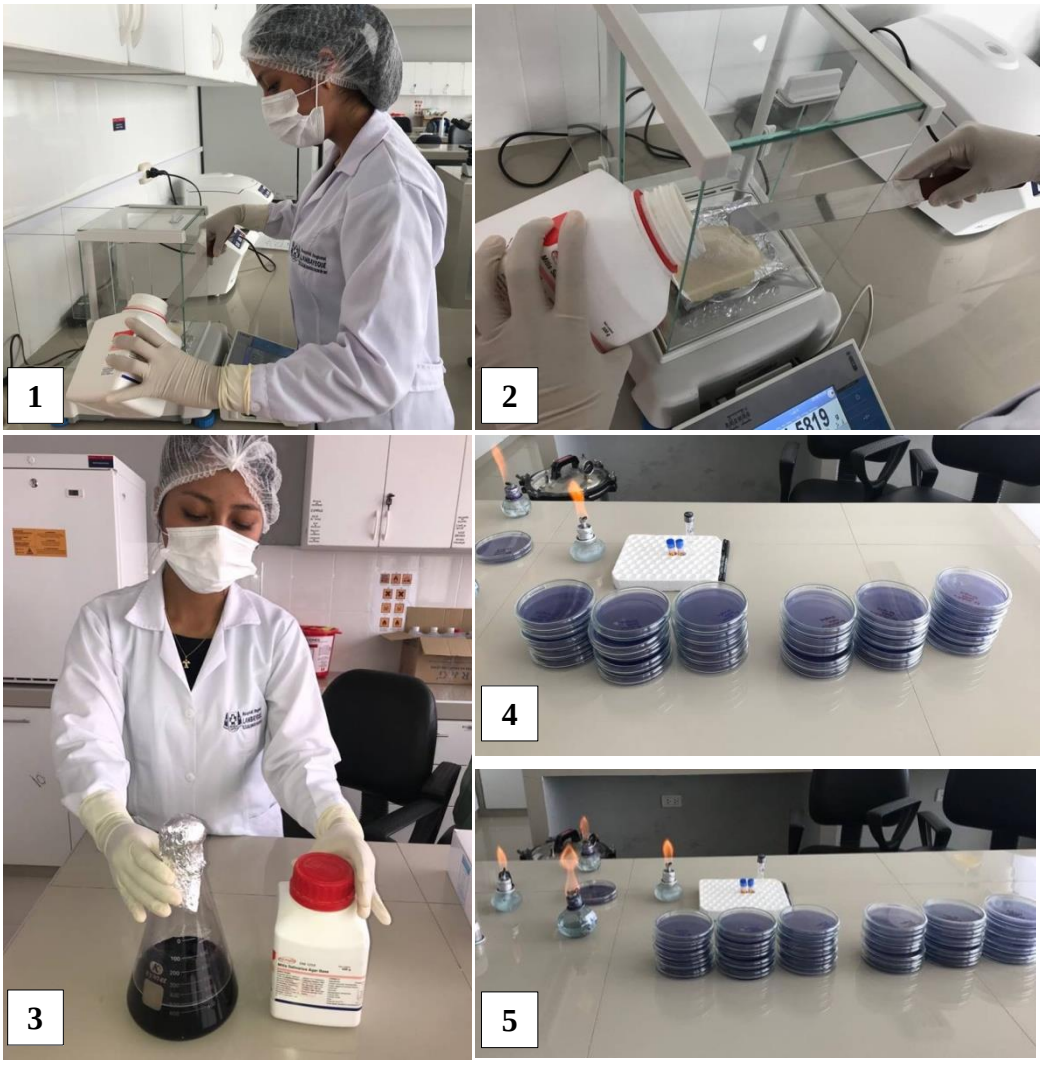
Me afirmo y me ratifico en lo expresado, en señal de lo cual firmo y coloco mi huella digital en el presente documento en la ciudad de Piura, a los 04 días del mes de octubre del año 2018.

MIGUEL ANGEL RUIZ BARRUETO
M.Sc. Biólogo-Microbiólogo
Candidato a Doctor en Ciencias Biomédicas
D.N.I. 42814146 - C.B.P. 8256



1. Material para el proceso de extracción.
2. Pesado del material vegetal.
3. , 4 y 5: Proceso de filtración de material vegetal macerado.
6. y 7: Secado de extractos vegetales.
8. Extracto seco en recipiente ámbar.

Anexo 5. Preparación de medios de cultivo para experimentación.



1. Foto 1 y 2 pesando el medio de cultivo Agar mitis salivarius en balanza analítica.
2. Foto 3 del cultivo en el matraz de preparación.
3. Foto 4 y 5. Medio de cultivo esterilizado en autoclave y servido en placas Petri estériles.

Anexo 6. Procesamiento.

1. Foto 1. Extractos vegetales preparados.
2. Foto 2 y 3. Siembra de las placas con el inóculo de *Enterococcus faecalis*.
3. Foto 4 y 5. Colocación de discos con concentraciones de extractos.

Anexo 7. Resultados recolectados.

	HALOS DE INHIBICIÓN EN MM PARA *Enterococcus faecalis*							
	Control negativo	Control positivo	Extracto acuoso			Extracto hidroetanólico		
N	Testigo	Clorhexidina 2%	15 mg/mL	30 mg/mL	45 mg/mL	15 mg/mL	30 mg/mL	45 mg/mL
1	0	28	10	8	12	25	25	26
2	0	28	10	7	12	25	24	24
3	0	29,5	9	7	11	22	26	24
4	0	24,5	8	8	11	25	26	26
5	0	26	7	8	10	23	25	25
6	0	29,5	11	10	12	25	24	25
7	0	28,5	7	9	11	25	23	27
8	0	31,5	7,5	8	12	24	22	24
9	0	31,5	10	7	10	21	22	25
10	0	29	7	8	9	23	23	23
11	0	29	8	9	10	25	28	24
12	0	27,5	9	10	12	23	30	22
13	0	28,5	8	10	11	22	24	24
14	0	32	7	11	10	20	23	22
15	0	28	8	9	9	24	21	25
16	0	30	8	8	11	19	24	24
17	0	30	8	7	10	25	22	24
18	0	27	7,5	7	10	24	24	23
19	0	29	8	7	11	23	25	22
20	0	25	7	8	9	24	22	23
Promedio	0	**28,6**	**8,25**	**8,3**	**10,65**	**23,35**	**24,15**	**24,1**

Anexo 8. Procesamiento estadístico de los datos en SPSS V.22

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Halos de Inhibición

HSD Tukey

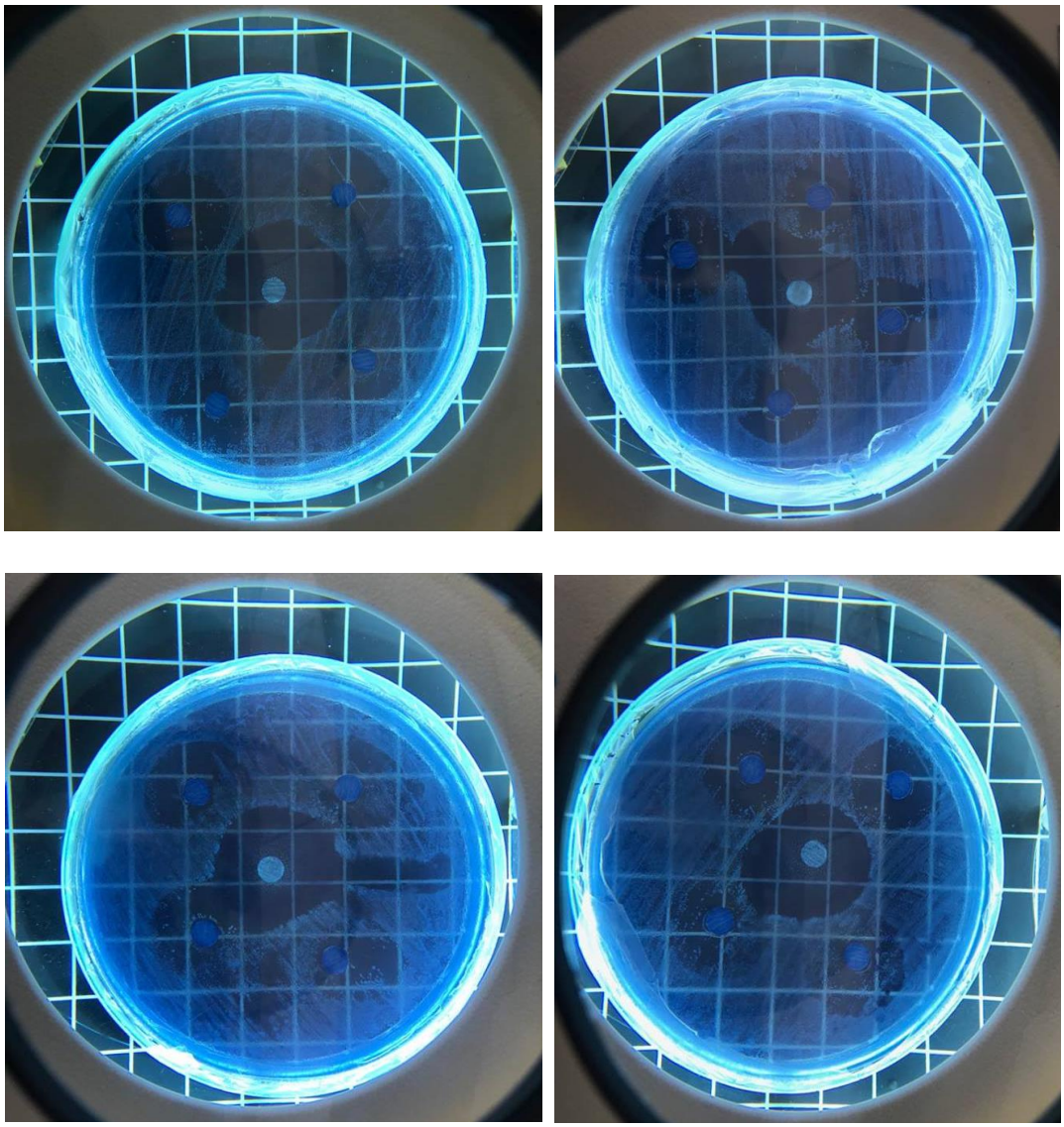
(I) Tratamientos en estudio	(J) Tratamientos en estudio	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Testigo	Clorhexidina 2%	-4.4295*	.05223	.000	-4.5904	-4.2686
	Extracto Acuoso 15mg/ml	-2.0280*	.05223	.000	-2.1889	-1.8671
	Extracto Acuoso 30mg/ml	-2.0440*	.05223	.000	-2.2049	-1.8831
	Extracto Acuoso 45mg/ml	-2.4105*	.05223	.000	-2.5714	-2.2496
	Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	-3.9320*	.05223	.000	-4.0929	-3.7711
	Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	-4.0125*	.05223	.000	-4.1734	-3.8516
	Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	-4.0095*	.05223	.000	-4.1704	-3.8486
Clorhexidina 2%	Testigo	4.4295*	.05223	.000	4.2686	4.5904
	Extracto Acuoso 15mg/ml	2.4015*	.05223	.000	2.2406	2.5624
	Extracto Acuoso 30mg/ml	2.3855*	.05223	.000	2.2246	2.5464
	Extracto Acuoso 45mg/ml	2.0190*	.05223	.000	1.8581	2.1799
	Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	.4975*	.05223	.000	.3366	.6584
	Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	.4170*	.05223	.000	.2561	.5779
	Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	.4200*	.05223	.000	.2591	.5809
Extracto Acuoso 15mg/ml	Testigo	2.0280*	.05223	.000	1.8671	2.1889
	Clorhexidina 2%	-2.4015*	.05223	.000	-2.5624	-2.2406
	Extracto Acuoso 30mg/ml	-.0160	.05223	1.000	-.1769	.1449
	Extracto Acuoso 45mg/ml	-.3825*	.05223	.000	-.5434	-.2216
	Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	-1.9040*	.05223	.000	-2.0649	-1.7431
	Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	-1.9845*	.05223	.000	-2.1454	-1.8236
	Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	-1.9815*	.05223	.000	-2.1424	-1.8206
Extracto Acuoso 30mg/ml	Testigo	2.0440*	.05223	.000	1.8831	2.2049
	Clorhexidina 2%	-2.3855*	.05223	.000	-2.5464	-2.2246

	Extracto Acuoso 15mg/ml	.0160	.05223	1.000	-.1449	.1769
	Extracto Acuoso 45mg/ml	-.3665*	.05223	.000	-.5274	-.2056
	Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	-1.8880*	.05223	.000	-2.0489	-1.7271
	Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	-1.9685*	.05223	.000	-2.1294	-1.8076
	Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	-1.9655*	.05223	.000	-2.1264	-1.8046
Extracto Acuoso 45mg/ml	Testigo	2.4105*	.05223	.000	2.2496	2.5714
	Clorhexidina 2%	-2.0190*	.05223	.000	-2.1799	-1.8581
	Extracto Acuoso 15mg/ml	.3825*	.05223	.000	.2216	.5434
	Extracto Acuoso 30mg/ml	.3665*	.05223	.000	.2056	.5274
	Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	-1.5215*	.05223	.000	-1.6824	-1.3606
	Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	-1.6020*	.05223	.000	-1.7629	-1.4411
	Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	-1.5990*	.05223	.000	-1.7599	-1.4381
Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	Testigo	3.9320*	.05223	.000	3.7711	4.0929
	Clorhexidina 2%	-.4975*	.05223	.000	-.6584	-.3366
	Extracto Acuoso 15mg/ml	1.9040*	.05223	.000	1.7431	2.0649
	Extracto Acuoso 30mg/ml	1.8880*	.05223	.000	1.7271	2.0489
	Extracto Acuoso 45mg/ml	1.5215*	.05223	.000	1.3606	1.6824
	Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	-.0805	.05223	.784	-.2414	.0804
	Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	-.0775	.05223	.815	-.2384	.0834
Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	Testigo	4.0125*	.05223	.000	3.8516	4.1734
	Clorhexidina 2%	-.4170*	.05223	.000	-.5779	-.2561
	Extracto Acuoso 15mg/ml	1.9845*	.05223	.000	1.8236	2.1454
	Extracto Acuoso 30mg/ml	1.9685*	.05223	.000	1.8076	2.1294
	Extracto Acuoso 45mg/ml	1.6020*	.05223	.000	1.4411	1.7629
	Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	.0805	.05223	.784	-.0804	.2414
	Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	.0030	.05223	1.000	-.1579	.1639
Extracto Hidroetanólico 45mg/ml	Testigo	4.0095*	.05223	.000	3.8486	4.1704
	Clorhexidina 2%	-.4200*	.05223	.000	-.5809	-.2591
	Extracto Acuoso 15mg/ml	1.9815*	.05223	.000	1.8206	2.1424
	Extracto Acuoso 30mg/ml	1.9655*	.05223	.000	1.8046	2.1264

Extracto Acuoso 45mg/ml	1.5990*	.05223	.000	1.4381	1.7599
Extracto Hidroetanólico 15mg/ml	.0775	.05223	.815	-.0834	.2384
Extracto Hidroetanólico 30mg/ml	-.0030	.05223	1.000	-.1639	.1579

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = .027.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 9. Fotografías de resultados.